BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

----------

**NGUYỄN VŨ SƠN**

# ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM, 2020-2021

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội – 2024**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

----------

**NGUYỄN VŨ SƠN**

# ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM, 2020-2021

**Ngành : Vi sinh vật học**
**Mã số : 9 42 01 07**

## LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

**Người hướng dẫn khoa học:**

1. ***PGS.TS. Nguyễn Lê Khánh Hằng***
2. ***TS. Hoàng Vũ Mai Phương***

**Hà Nội – 2024**

# LỜI CAM ĐOAN

Tôi, Nguyễn Vũ Sơn, Nghiên cứu sinh khóa 38, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, chuyên ngành vi sinh vật học, xin cam đoan:

1. Đây là công trình nghiên cứu do bản thân trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của các Cô hướng dẫn;

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam;

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của các cơ sở nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

**Nghiên cứu sinh**

***Nguyễn Vũ Sơn***

# LỜI CẢM ƠN

Kính thưa quý Thầy/Cô,

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS NGUYỄN LÊ KHÁNH HẰNG và TS HOÀNG VŨ MAI PHƯƠNG, 2 người thầy hướng dẫn đã hỗ trợ và kiên nhẫn chỉ bảo tôi suốt quá trình thực hiện luận án này. Sự quan tâm và kiến thức chuyên môn sâu rộng đã là nguồn cảm hứng vô giá, giúp tôi vượt qua mọi khó khăn trong quá trình nghiên cứu.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến GS. TS LÊ THỊ QUỲNH MAI, người đã tận tình giúp đỡ tôi từ những ngày đầu tiên bước chân vào con đường khoa học, tiếp cận với những kiến thức nâng cao để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Tôi không thể không nhắc đến sự đóng góp quan trọng của các bạn bè đồng nghiệp tại Phòng thí nghiệm Cúm - Khoa Virus - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, những người đã chia sẻ thông tin, kiến thức và cùng tôi trao đổi, thảo luận về các vấn đề khoa học, giúp tôi mở rộng hiểu biết và hoàn thiện nghiên cứu của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Trung tâm Đào tạo và Quản lý khoa học đã tạo điều kiện tốt nhất, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ từ các Trung tâm Kiểm soát bệnh tật (CDC) các tỉnh, thành phố đã hỗ trợ và cung cấp các mẫu bệnh phẩm cho đề tài nghiên cứu của chúng tôi. Sự hợp tác và đóng góp của các CDC là yếu tố quan trọng giúp đề tài đạt được những kết quả khả quan, đồng thời góp phần nâng cao hiệu quả trong công tác nghiên cứu khoa học và chăm sóc sức khỏe cộng đồng

Một lời cảm ơn đặc biệt gửi đến gia đình tôi, những người luôn ủng hộ tôi về mọi mặt, từ tinh thần đến vật chất. Sự hy sinh và tin tưởng không giới hạn của họ là nguồn động viên to lớn giúp tôi không ngừng nỗ lực và tiếp tục cố gắng.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn tất cả những ai đã giúp đỡ, hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu, dù là nhỏ nhất. Mọi sự giúp đỡ đều đã góp phần quan trọng vào sự thành công của luận án này.

**Nguyễn Vũ Sơn**

# MỤC LỤC

**ĐẶT VẤN ĐỀ ..... 1**

**CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN ..... 4**

1.1. TÌNH HÌNH DỊCH COVID-19 TRÊN THẾ GIỚI VÀ TẠI VIỆT NAM... 4

*1.1.1. Tình hình dịch COVID-19 trên thế giới..... 4*

*1.1.2. Tình hình dịch COVID-19 tại Việt Nam ..... 8*

1.2. SARS-COV-2 ..... 12

*1.2.1. Phân loại ..... 12*

*1.2.2. Hình thái, cấu trúc và hệ gen SARS-CoV-2..... 15*

*1.2.3. Quá trình nhân lên của SARS-CoV-2 ..... 20*

1.3. BIẾN THỂ SARS-COV-2..... 21

1.4. VẮC XIN COVID-19 ..... 30

1.5. CHẨN ĐOÁN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM ..... 36

*1.5.1 Phương pháp phát hiện kháng nguyên ..... 36*

*1.5.2. Phương pháp phát hiện vật liệu di truyền ..... 37*

**CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ..... 43**

2.1. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU NỘI DUNG 1 ..... 44

*2.1.1. Đối tượng nghiên cứu..... 44*

*2.1.2. Thiết kế nghiên cứu ..... 45*

*2.1.3. Cỡ mẫu, thời gian và địa điểm ..... 45*

*2.1.4. Biến số nghiên cứu ..... 47*

*2.1.5. Phương pháp xét nghiệm..... 47*

*2.1.6. Quản lý và phân tích dữ liệu ..... 51*

*2.1.7. Hạn chế sai số ..... 51*

*2.1.8. Đạo đức trong nghiên cứu..... 52*

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỤC TIÊU 2 ..... 52

*2.2.1. Đối tượng nghiên cứu..... 52*

*2.2.2. Thiết kế nghiên cứu: Phân tích phòng thí nghiệm..... 52*
*2.2.3. Cỡ mẫu, thời gian và địa điểm ..... 53*
*2.2.4. Biến số nghiên cứu ..... 55*
*2.2.5. Phương pháp xét nghiệm..... 55*
*2.2.6. Quản lý và phân tích dữ liệu ..... 57*
*2.2.7. Hạn chế sai số ..... 59*
**CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ ..... 61**
3.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ DƯƠNG TÍNH SARS-COV-2 TRONG CÁC MẪU THU THẬP TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP REALTIME RT-PCR, 2020-2021 ..... 61
*3.1.1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 theo tháng và địa điểm thu thập, 1/2020-8/2020..... 61*
*3.1.2. Kết quả tải lượng RNA SARS-CoV-2 và mối tương quan giữa tải lượng virus với giá trị Ct, 1/2020-8/2020..... 63*
*3.1.3. Phân bố các ca nhiễm SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020-2021 ..... 68*
*3.1.4. Phân lập SARS-CoV-2..... 71*
*Hình 3. 8. A. Hình ảnh tế bào Vero – E6 chưa gây nhiễm. B. Hình ảnh SARS-CoV-2 nhân lên trong tế bào Vero – E6 sau 72h ..... 72*
3.2. PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN THẾ HỆ MỚI, 2020-2021..... 73
*3.2.1. Thông tin các mẫu giải trình tự..... 73*
*3.2.2. Đặc điểm phân tử biến thể SARS-CoV-2 tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 2020-2021..... 74*
*3.2.3. Sự thay đổi nucleotide và axit amin trong hệ gen SASR-CoV-2, 2020-2021..... 81*

**CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN ..... 93**

4.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ DƯƠNG TÍNH SARS-COV-2 TRONG CÁC MẪU THU THẬP TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP REALTIME RT-PCR, 2020-2021 ..... 93

*4.1.1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT- PCR, 2020-2021 ..... 93*

*4.1.2. Tải lượng RNA SARS-CoV-2 và mối tương quan giữa tải lượng virus và giá trị Ct, 1/2020-8/2020 ..... 95*

*4.1.3. Phân lập SARS-CoV-2 ..... 98*

4.2. ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM, 2020-2021 ..... 99

4.3. TÍNH MỚI VÀ MỘT SỐ HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU ..... 108

*4.3.1. Tính mới của nghiên cứu ..... 108*

*4.3.2. Một số hạn chế của nghiên cứu ..... 109*

**KẾT LUẬN ..... 111**

**KHUYẾN NGHỊ ..... 113**

**TÀI LIỆU THAM KHẢO ..... 1**

**PHỤ LỤC**

# CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| Chữ viết tắt | Tiếng Anh | Tiếng Việt |
|---|---|---|
| TCYTTG | The World Health Organization | Tổ chức Y tế Thế giới |
| SARS-CoV | Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus | Hội chứng hô hấp cấp tính nặng do coronavirus SARS |
| MERS-CoV | Middle East respiratory syndrome coronavirus | Hội chứng hô hấp cấp Trung Đông do coronavirus MERS |
| COVID-19 | Coronavirus disease 2019 | Hội chứng hô hấp cấp tính do SARS-CoV-2 |
| hCoV | Human Coronavirus | Virus corona gây bệnh ở người |
| ICTV | The International Committee on Taxonomy of Viruses | Ủy ban Quốc tế về Phân loại virus |
| RTC | Replication/transcription complex | Phức hợp protein sao chép – phiên mã |
| VOI | Variants of Interest | Biến thể quan tâm |
| VOC | Variants of Concern | Biến thể quan ngại |
| VUM | Variant under Monitoring | Biến thể đang theo dõi |
| ICU | Intensive care unit | Điều trị tích cực |
| NGS | Next Generation Sequencing | Phương pháp giải trình tự thế hệ mới |
| GISAID | Global Initiative on Sharing All Influenza Data | Sáng kiến toàn cầu về chia sẻ dữ liệu bệnh cúm |
| PANGOLIN | Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages | Hệ thống danh pháp phát sinh chủng loại |
| RNA | Ribonucleic acid | Axit ribonucleic |

# DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1. 1. Làn sóng dịch tại Việt Nam (tháng 1/2020 - 9/2021) ..... 8

Bảng 1. 2. Vai trò các protein không cấu trúc của SARS-CoV-2 ..... 18

Bảng 1. 3. Biến thể quan tâm - Variants of Interest (VOIs) ..... 23

Bảng 1. 4. Biến thể quan ngại - (Variants of Concern -VOCs) ..... 24

Bảng 1. 5. Công nghệ sản xuất vắc xin đã được cấp phép/đang thử nghiệm lâm sàng (tính đến 30/3/2023) ..... 32

Bảng 1. 6. Một số vắc xin COVID-19 được cấp phép trên thế giới ..... 35

Bảng 1. 7. Một số sinh phẩm chẩn đoán nhanh đã được Bộ Y tế cấp phép lưu hành .....**Error! Bookmark not defined.**

Bảng 1. 8. Các gen đích được khuyến cáo chẩn đoán SARS-CoV-2 (tháng 1/2020)..... 38

Bảng 1. 9. Một số sinh phẩm chẩn đoán Realtime RT-PCR đã được Bộ Y tế cấp phép lưu hành ..... 39

Bảng 2. 1. Số lượng mẫu từ 28 tỉnh/thành phố miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 1/2020- 8/2020..... 45

Bảng 2. 2. Biến số và chỉ số nghiên cứu ..... 47

Bảng 2. 3. Trình tự mồi và probe Charité – Berlin theo khuyến cáo của TCYTTG (17/1/2020) ..... 48

Bảng 2. 4. Biến số và chỉ số nghiên cứu ..... 55

Bảng 2. 5. Hệ thống mồi sử dụng khuếch đại hệ gen SARS-CoV-2 ..... 56

Bảng 2. 6. Tiêu chuẩn kỹ thuật trong kỹ thuật giải trình tự gen..... 60

Bảng 3. 1. So sánh các mẫu dương tính theo giá trị Ct ở nhóm người nhập cảnh và nhóm cộng đồng ..... 64

Bảng 3. 2. Kết quả các mẫu dương tính và giá trị Ct theo số lần thu thập mẫu ..... 65

Bảng 3. 3. Kết quả phân lập SARS-CoV-2 trên tế bào Vero E6 và mối tương quan với giá trị Ct..... 71

Bảng 3. 4. Số mẫu thực hiện giải trình tự gen bằng Illumina Iseq100, 2020-2021 ..... 73

Bảng 3. 5. Các biến thể SARS-CoV-2 tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 2020 - 2021 ..... 75

Bảng 3. 6. Phân bố các biến thể SARS-CoV-2 theo tỉnh/thành phố trong 4 làn sóng dịch, 2020-2021 ..... 78

Bảng 3. 7. Phân bố các biến thể Delta trong nghiên cứu theo tỉnh/thành phố (n=328) ..... 88

Bảng 3. 8. Sự thay đổi axit amin trên protein S của các biến thể SARS-CoV-2 so với chủng gốc Vũ Hán , 2020 - 2021..... 90

Bảng 4. 1. Nguồn gốc các biến thể Delta lưu hành tại Việt Nam ..... 106

# DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1. 1. Các sự kiện chính của đợt bùng phát COVID-19 ..... 4

Hình 1. 2. Phân bố các ca mắc COVID-19 theo 6 khu vực trên thế giới theo TCYTTG ..... 6

Hình 1. 3. Thông tin về vắc xin COVID-19 tại Việt Nam ..... 10

Hình 1. 4. Phân loại Coronavirus ..... 14

Hình 1. 5. Cấu trúc SARS-CoV-2 và protein gai (S) ..... 15

Hình 1. 6. Hệ gen và các sản phẩm protein của SARS-CoV-2 ..... 17

Hình 1. 7. Quá trình nhân lên của SARS-CoV-2 trong tế bào vật chủ ..... 20

Hình 1. 8. Các điểm đột biến chính trên cấu trúc tinh thể của protein S trong phức hợp vùng gắn thụ thể ACE2 ..... 25

Hình 1. 9. Phân loại các biến thể theo Nextstrain 2022 ..... 25

Hình 1. 10. Biến thể SARS-CoV-2 lưu hành theo thời gian và các đột biến axit amin trên protein S1 ..... 26

Hình 1. 11. Các đột biến điển hình trên protein S ở các biến thể SARS-CoV-2 ..... 27

Hình 1. 12. Công nghệ sản xuất vắc xin COVID-19..... 31

Hình 2. 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu ..... 43

Hình 2. 2. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu mục tiêu 2 ..... 54

Hình 3. 1. Mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 thu thập theo tháng tại miền Bắc Việt Nam, 1/2020 - 8/2020..... 62

Hình 3. 2. Mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 thu thập tại 28 tỉnh/thành và bệnh viện, 1/2020 - 8/2020 ..... 63

Hình 3. 3. Tải lượng RNA SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính, 1/2020-8/2020 ..... 66

Hình 3. 4. Phân tích tải lượng virus trong mẫu bệnh lâm sàng theo nhóm nhập cảnh và nhóm cộng đồng tại Việt Nam ..... 67

Hình 3. 5. Các trường hợp khẳng định dương tính phân bố theo thời gian, 9/2020 –12/2021 ..... 68

Hình 3. 6. Phân bố các ca dương tính SARS-CoV-2 theo độ tuổi và giới tính, 2020-2021 ..... 69

Hình 3. 7. Phân bố các ca dương tính SARS-CoV-2 theo tỉnh, 2020-2021 ... 70

Hình 3. 8. A. Hình ảnh tế bào Vero – E6 chưa gây nhiễm. B. Hình ảnh SARS-CoV-2 nhân lên trong tế bào Vero – E6 sau 72h..... 72

Hình 3. 9. Hình ảnh SARS-CoV-2 trong dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)..... 72

Hình 3. 10. Phân bố các dòng SARS-CoV-2, 2020-2021 (Nextstrain)..... 77

Hình 3. 11. Cây phát sinh chủng loại của các biến thể SARS-CoV-2 ở miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 1/2020-4/2021 ..... 82

Hình 3. 12. Cây phát sinh chủng loại biến thể Alpha/20I tại các ổ dịch COVID-19, 1/2021 - 4/2021..... 83

Hình 3. 13. Cây phát sinh chủng loại biến thể Delta lưu hành tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 4/2021-12/2021 ..... 85

Hình 3. 14. Cây phát sinh chủng loại biến thể Delta lưu hành tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 2021..... 86

Hình 3. 15. Sự thay đổi về nucleotide (A) và axit amin tương ứng (B) với từng gen của các biến thể SARS-CoV-2 ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020 – 2021 ..... 89

Hình 3. 16. Các đột biến trên biến thể AY.57 ..... 91

# ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh truyền nhiễm do virus gây nên trong thế kỷ XXI đang là một thách thức lớn trong hệ thống Y tế tại Việt Nam và các quốc gia trên thế giới. Căn nguyên virus là nguyên nhân chủ yếu gây ra những vụ dịch nguy hiểm đe doạ tới sức khoẻ của con người, điển hình là các vụ dịch xảy ra gần đây như dịch SARS năm 2003, dịch cúm gia cầm A/H5N1 trên người tại Việt Nam năm 2004, dịch viêm đường hô hấp cấp Trung Đông (MERS-CoV), dịch cúm A/H1N1 năm 2009. Virus SARS-CoV 20 năm trước đây đã gây dịch tại 29 nước và vùng lãnh thổ, trên 8000 trường hợp nhiễm bệnh trong đó có 774 trường hợp tử vong (9,6%). Tại Việt Nam, số ca nhiễm SARS-CoV tính đến tháng 7 năm 2003 là 63 trường hợp, trong đó có 5 trường hợp tử vong [115, 144]. Năm 2012, thế giới đã ghi nhận một loại virus thuộc họ Corona xuất hiện tại vùng Trung Đông, gây bệnh đường hô hấp, gây suy thận dẫn tới tử vong, đó là MERS-CoV. Virus này gây các vụ dịch tại vùng Tây Á, chủ yếu là Ả rập Xê út [110]. Tuy nhiên năm 2015, tại Hàn Quốc đã ghi nhận 186 trường hợp nhiễm (38 trường hợp tử vong), hơn 16.000 người đã phải cách ly do tiếp xúc với người bệnh[55]. SARS-CoV và MERS-CoV được cho là có nguồn gốc từ động vật lây truyền sang người, động vật truyền bệnh là chồn sương (SARS-CoV); dơi, lạc đà một bướu (MERS-CoV)[55, 81].

Với SARS-CoV, protein gai liên kết với thụ thể tế bào ACE2 để tiến hành hoà màng, trong khi đó với MERS-CoV protein gai gắn với thụ thể DPP4 [57, 102]. Chính sự liên kết này đã góp phần làm tình trạng tổn thương phổi trầm trọng hơn

Tháng 12/2019, một loại virus corona mới (Novel coronavirus – nCoV) đã được phát hiện tại thành phố Vũ Hán, Trung Quốc. Nghiên cứu về virus học, cho thấy nCoV có mối quan hệ với virus gây viêm đường hô hấp cấp (VĐHHC) năm 2003 (SARS-CoV), nCoV đã được đổi tên thành SARS-CoV-2. Đến nay,

thế giới đã ghi nhận trên 773 triệu ca COVID-19 với 7 triệu ca tử vong (31/12/2023) [3]. Tại Việt Nam, trường hợp nhiễm SARS-CoV-2 đầu tiên được ghi nhận tại TP Hồ Chí Minh vào ngày 32/1/2020. Việt Nam đã trải qua 4 làn sóng dịch với tổng số ca được ghi nhận là 11.624.114 ca, 43.206 (0,4%) ca tử vong.

Trong giai đoạn đầu của đại dịch, xét nghiệm là một phần chiến lược quan trọng để kiểm soát sự lây truyền của dịch bệnh, trì hoãn sự lây truyền để có một khoảng thời gian cần thiết phát triển vắc xin và thuốc điều trị đặc hiệu. Vì vậy, việc giám sát tỷ lệ nhiễm SARS-CoV-2 và điều chỉnh chiến lược xét nghiệm phù hợp theo từng giai đoạn là hết sức quan trọng.

Trong giai đoạn 2020-2023, SARS-CoV-2 đã xuất hiện các biến thể gây tăng nguy cơ đối với sức khoẻ cộng đồng toàn cầu đã thúc đẩy việc mô tả đặc điểm của các biến thể, nhằm ưu tiên theo dõi và nghiên cứu toàn cầu, để có những đáp ứng phù hợp đối với đại dịch COVID-19. Biến thể SARS-CoV-2 đã ghi nhận bao gồm virus gốc Vũ Hán, biến thể Alpha (virus lần đầu được ghi nhận tại Anh tháng 9/2020), biến thể Beta (tại Nam Phi tháng 5/2020), biến thể Delta (tại Ấn Độ tháng 10/2020) và biến thể Omicron (tại Nam Phi tháng 11/2021)[81]. Sự xuất hiện các biến thể mới và giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh COVID-19 cũng như các biến chứng liên quan là vấn đề được quan tâm trên toàn cầu. Việc nghiên cứu, xác định các đột biến đáng quan tâm của SARS-CoV-2 cần được cập nhật trong vắc xin COVID-19.

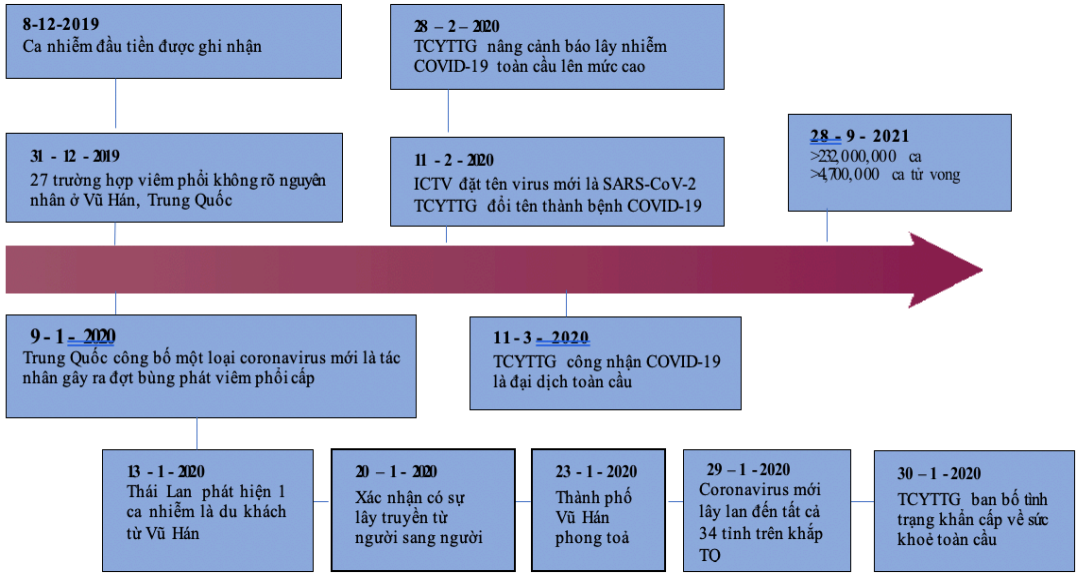
Vì vậy, để cập nhật các thông tin virus học của SARS-CoV-2, nghiên cứu **"Đặc điểm phân tử của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020-2021"** được thực hiện với 2 mục tiêu:

1. Xác định tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 trong các mẫu thu thập tại miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT- PCR, 2020-2021.
2. Phân tích đặc điểm phân tử của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới, 2020-2021.

# CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

## 1.1. TÌNH HÌNH DỊCH COVID-19 TRÊN THẾ GIỚI VÀ TẠI VIỆT NAM

### *1.1.1. Tình hình dịch COVID-19 trên thế giới*

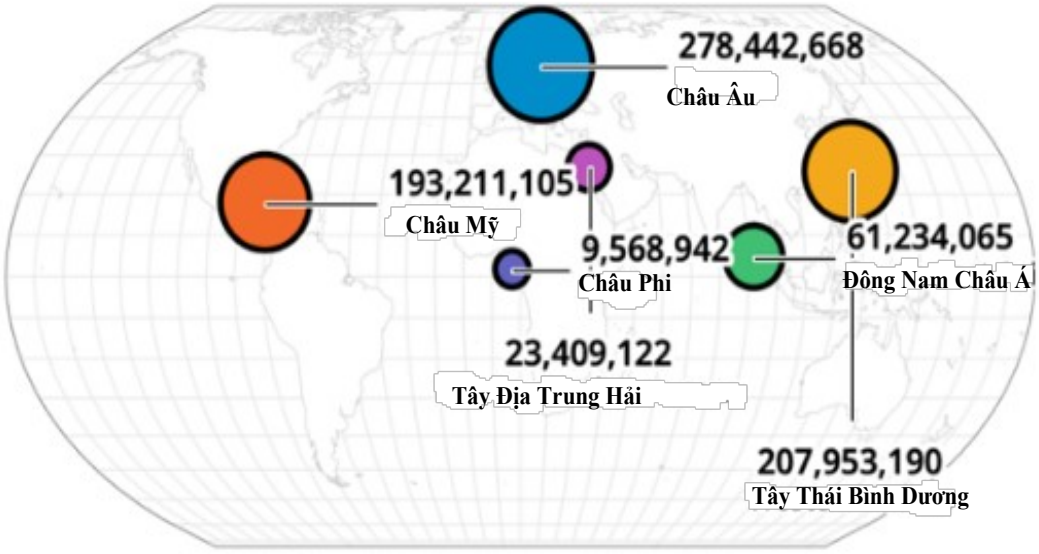



**Hình 1. 1. Các sự kiện chính của đợt bùng phát COVID-19 [46]**

Vào cuối tháng 12 năm 2019, tại Vũ Hán, Trung Quốc, xuất hiện nhiều bệnh nhân bị viêm phổi không rõ nguyên nhân tương tự như bệnh nhân SARS và MERS, có các triệu chứng của viêm phổi do virus, bao gồm sốt, ho và khó chịu ở ngực, ở những trường hợp nghiêm trọng là khó thở và có hình ảnh tổn thương phổi. Trong số 27 bệnh nhân nhập viện đầu tiên được ghi nhận, hầu hết các trường hợp đều có liên quan đến chợ Hoa Nam, nơi không chỉ bán hải sản mà còn cả động vật sống, bao gồm cả gia cầm và động vật hoang dã [32, 117]. Vào ngày 31 tháng 12, Ủy ban Y tế thành phố Vũ Hán đã thông báo về một đợt bùng phát viêm phổi không xác định nguyên nhân và đồng thời thông báo cho Tổ chức Y tế thế giới (TTYTTG) [146].

Ngày 9/1/2020, Trung Quốc xác định rằng tác nhân gây ra căn bệnh viêm phổi mới nổi này là một loại Betacoronavirus chưa từng công bố trước đây [34, 72, 129]. Trong vòng 1 tháng, dịch bệnh đã nhanh chóng lan ra 34/34 tỉnh/thành phố của Trung Quốc và quốc gia, vùng lãnh thổ bên ngoài Trung Quốc [125]. Trung Quốc đã triển khai các biện pháp can thiệp mạnh mẽ nhằm ngăn chặn sự lan rộng của virus như phong tỏa thành phố Vũ Hán và vùng phụ cận cũng như nghiêm cấm đi và đến vùng dịch [121].

Ngày 30/1/2020, Tổ chức Y tế thế giới (TTYTTG) đã ban bố "Tình trạng Y tế khẩn cấp về sức khỏe cộng đồng toàn cầu" đối với sự lây lan của coronavirus bên ngoài Trung Quốc, mô tả đây là sự bùng phát chưa từng có tiền lệ [41, 96]. Ngày 11/2/2020, Uỷ ban quốc tế về phân loại virus (ICTV) đã đặt tên cho virus nCoV là SARS-CoV-2 và bệnh gây viêm phổi lạ là COVID-19[14]. Với sự lây lan rộng của dịch viêm đường hô hấp cấp (VĐHHC) tại các quốc gia thuộc các châu lục khác nhau trên thế giới, ngày 11/3/2020 TCYTTG đã công bố dịch VĐHHC do SARS-CoV-2 trở thành "Đại dịch VĐHHC - COVID-19" [20, 28]. Tính đến ngày 12/2/2020, 45.171 trường hợp xác định nhiễm SARS-CoV-2, trong đó 44.730 (99%) trường hợp tại Trung Quốc đã được báo cáo, bao gồm 8.204 (18,2%) bệnh nhân ở trong tình trạng bệnh nặng và 1.068 trường hợp tử vong trên thế giới [125]. Kể từ khi được ghi nhận, dịch tễ của bệnh COVID-19 thay đổi từng ngày, số ca mắc tăng gấp đôi khi tăng từ 6,4 đến 7,4 ngày [96]. Tỷ lệ chết/mắc là 2,1%, cao hơn so với bệnh nhiễm trùng hô hấp thông thường như cúm mùa (tỷ lệ tử vong là 0,15-0,25%) nhưng COVID-19 thấp hơn rất nhiều với bệnh do virus corona khác, thấp hơn gần 5 lần so với SARS-CoV (10%), thấp hơn 17 lần so với MERS-CoV (34,4%)[130].




**Hình 1. 2. Phân bố các ca mắc COVID-19 theo 6 khu vực trên thế giới theo TCYTTG**

**(https://covid19.who.int/ 31/12/2023)**

Miễn dịch cộng đồng là một hình thức bảo vệ gián tiếp trong phòng chống bệnh truyền nhiễm khi một tỷ lệ lớn quần thể người đã có miễn dịch với SARS-CoV-2, chu trình lây nhiễm dễ bị phá vỡ, làm cho sự lây lan của dịch bệnh dừng hoặc chậm lại. Chính vì vậy đã tạo nên một lớp bảo vệ cho những người chưa có miễn dịch.

Chính sách kiểm soát dịch bệnh của các nước châu Âu như Anh, Pháp, Tây Ban Nha, hay Mỹ…là tạo "miễn dịch cộng đồng" với 2/3 dân số nhiễm virus và sản sinh kháng thể, hoặc nghiên cứu, sản xuất được vắc xin với khả năng phân phối rộng rãi. Các nước châu Âu, Mỹ quan điểm rằng "mọi người sẽ bị phơi nhiễm", những biện pháp cách ly, giám sát chỉ kéo dài thời gian xuất hiện các ca bệnh nghiêm trọng, về cơ bản không ngăn chặn được dịch bệnh cho tới khi đạt được mục tiêu miễn dịch cộng đồng. Tuy nhiên, chính sách này dường như đã không mang đến được kết quả mong muốn với tỷ lệ mắc/tử vong

cao, tình trạng quá tải không kiểm soát được của dịch bệnh tại thời điểm đó. Các nước châu Âu, Mỹ đã phải thay đổi chiến lược kiểm soát dịch COVID-19 bằng biện pháp kiểm soát các ca bệnh, cách ly các ca tiếp xúc, chính sách giãn cách xã hội và nghiên cứu phát triển vắc xin. Đến nay, thế giới đã ghi nhận trên 773 triệu ca COVID-19 với 7 triệu ca tử vong (31/12/2023)[6].

Sau 3 năm đại dịch, ngày 5/5/2023, TCYTTG đưa ra công bố dịch COVID-19 không còn được coi là tình trạng khẩn cấp về sức khỏe cộng đồng gây quan ngại quốc tế và chuyển từ giai đoạn khẩn cấp sang quản lý bệnh lâu dài dựa trên các chỉ số như số ca bệnh tử vong, tỷ lệ tử vong do COVID-19 đã giảm nhanh và ổn định trong thời gian gần đây. Đồng thời, số lượng người bệnh phải nhập viện và trường hợp nặng, phải điều trị tích cực đã giảm đáng kể. Điều này cho thấy những biện pháp kiểm soát dịch bệnh mà các quốc gia trên thế giới triển khai đạt được kết quả tích cực [61, 145].

Theo TCYTTG, các quốc gia đã đẩy mạnh việc tiêm chủng cho gần 70% dân số thế giới, nhưng điều này cũng có nghĩa là hơn 30% dân số thế giới vẫn chưa được tiêm chủng. Mặc dù có một tỷ lệ cao có kháng thể do nhiễm COVID-19 và/hoặc tiêm chủng, khoảng cách lớn về khả năng miễn dịch nhờ vắc xin vẫn tồn tại, đặc biệt ở các nước thu nhập thấp, thu nhập trung bình thấp và trong số những nước có nguy cơ mắc bệnh nặng. Tính đến ngày 05/4/2023, 89% nhân viên y tế và 82% người lớn tuổi trên thế giới đã được tiêm chủng cơ bản đầy đủ vắc xin ngừa COVID-19;  trên toàn bộ dân số là 66%. Tuy nhiên, tỷ lệ tiêm chủng cơ bản cho nhân viên y tế ở các nước thu nhập thấp (LIC) là 52% và đối với người già là 35%; và tỷ lệ bao phủ liều tăng cường vẫn còn rất thấp trên toàn cầu, với sự khác biệt đáng kể giữa và trong từng quốc gia [1, 33].

Việc kết thúc tình trạng khẩn cấp toàn cầu chỉ là một bước chuyển để giảm các biện pháp hạn chế di chuyển, trong khi các quốc gia vẫn cần duy trì biện pháp phòng, chống dịch bệnh.

### *1.1.2. Tình hình dịch COVID-19 tại Việt Nam*

Sự xâm nhập và lây truyền qua tiếp xúc gần của bệnh COVID-19 đã dấy lên quan ngại về tốc độ lây truyền từ người sang người tại Việt Nam, nước có chung đường biên giới với Trung Quốc với diện tích nhỏ và đông dân cùng với nguồn lực hạn chế. Theo Bộ Y tế, kể từ khi trường hợp COVID-19 đầu tiên được xác nhận vào ngày 23/1/2020 đến tháng 10/2023, Việt Nam đã trải qua 4 làn sóng dịch với tổng số ca được ghi nhận là 11.624.114 ca, 43.206 (0,4%) ca tử vong. Việt Nam đã tiêm hơn 266 triệu liều vắc xin phòng COVID-19. SARS-CoV-2 gây bệnh COVID-19 cũng đã phân lập thành công tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương và Viện Pasteur Hồ Chí Minh [60].

**Bảng 1. 1. Làn sóng dịch tại Việt Nam (tháng 1/2020 - 9/2021)[79]**

| Giai đoạn | Thời gian | Số ca mắc | | | Số ca tử vong (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Trong nước | Nhập cảnh | Tổng số | |
| Làn sóng dịch 1 | 23/1-16/04/2020 | 100 | 309 | 409 | 0 |
| Làn sóng dịch 2 | 25/7-01/12/2020 | 554 | 582 | 1.136 | 35 |
| Làn sóng dịch 3 | 28/1-25/03/2021 | 910 | 391 | 1.301 | 0 |
| Làn sóng dịch 4 | 27/4-12/09/2021 | 601 349 | 1 759 | 603 108 | 15 018 |

- Làn sóng lây nhiễm thứ 1: Ngày 23/1/2020, Việt Nam chính thức bước vào cuộc chiến chống COVID-19. Bệnh viện Chợ Rẫy (TP HCM) xác nhận 2 bệnh nhân COVID-19 đầu tiên tại Việt Nam, là hai cha con người Vũ Hán - Trung Quốc. Đến ngày 30/1/2020 đã xác định được thêm 5 ca bệnh đều từ Vũ Hán trở về. Trong khoảng thời gian 23/1 đến 4/3/2020 đã ghi nhận 16 ca bệnh SARS-CoV-2, trong đó có 15 ca bệnh tại Sơn Lôi, Vĩnh Phúc. Tỉnh Vĩnh Phúc quyết định cách ly toàn bộ xã Sơn Lôi, huyện Bình Xuyên.

Ngày 6/3/2020, Việt Nam công bố ca bệnh thứ 17 là công dân Hà Nội trở về từ Châu Âu (Anh). Ngày 31/3/2020, Chính phủ ban hành Chỉ thị số 16 về việc cách ly xã hội trên phạm vi cả nước trong vòng 15 ngày để phòng chống COVID-19, từ 0 giờ ngày 1/4/2020. Đến ngày 23/4/2023, cả nước cơ bản dừng giãn cách xã hội nhưng vẫn tiếp tục đảm bảo các quy tắc phòng chống dịch.

- Làn sóng lây nhiễm thứ 2 với tâm điểm là Đà Nẵng, là sự khác biệt rất lớn về quy mô và tính chất so với làn sóng lần thứ 1. Ca bệnh đầu tiên được xác định tại Bệnh viện C Đà Nẵng ngày 25/7/2020 và sau đó là tại Bệnh viện Đà Nẵng với 11 ca bệnh chỉ sau 2 ngày. Thành phố Đà Nẵng khởi động giãn cách xã hội trên toàn thành phố. Từ ngày 31/7/2020, Việt Nam bắt đầu ghi nhận những ca tử vong đầu tiên. Đà Nẵng được coi là đơn vị đầu tiên của cả nước triển khai xét nghiệm mẫu gộp 5 để tăng công suất xét nghiệm. Tổng số ca nhiễm SARS-CoV-2 tại làn sóng dịch thứ 2 là 1.136 trường hợp với 35 ca tử vong.

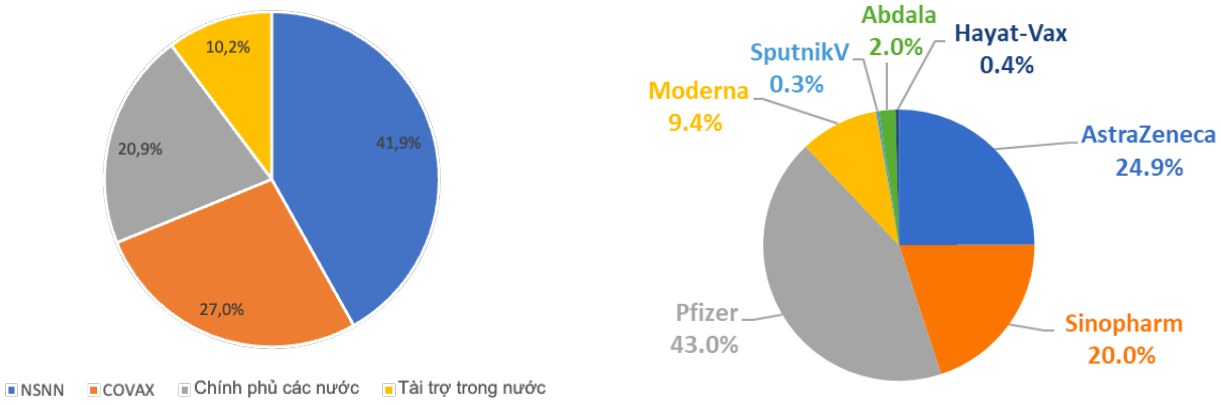
- Làn sóng lây nhiễm thứ 3 tại Hải Dương và Quảng Ninh ngày 27/1/2021. Trong đợt dịch này, Việt Nam ghi nhận 13 tỉnh, thành phố có xuất hiện ca nhiễm song nhìn chung là thấp.

- Làn sóng lây nhiễm thứ 4 tại Yên Bái ngày 27/2/2021. Sau đó xuất hiện dịch tại Bắc Giang, chỉ sau gần 2 tháng sau, dịch COVID-19 đã lây mạnh trong các khu công nghiệp, biến Bắc Giang thành tâm dịch lớn nhất cả nước vào thời điểm đó. Lần đầu tiên test nhanh kháng nguyên được đề xuất triển khai để sàng lọc tại các nơi có nguồn lây.

Ngày 26/5/2021, Hồ Chí Minh phát hiện những ca nhiễm đầu tiên của chuỗi lây từ nhóm truyền giáo. Tổng số ca bệnh ghi nhận tại làn sóng dịch thứ 4 đến 12/9/2021 là 603 108 ca bệnh, đưa tổng số mắc tại Việt Nam là 605954 trường hợp, 15 053 ca tử vong.

Như vậy, chiến lược kiểm soát đại dịch COVID-19 tại Việt Nam có thể chia thành 2 giai đoạn: Giai đoạn 1 thực hiện chính sách "zero COVID" theo chiến lược " dự phòng, phát hiện, cách ly, khoanh vùng, kiểm soát nhập cảnh và điều trị hiệu quả" đã được thực hiện thành công trong 3 làn sóng dịch đầu và thời gian đầu của làn sóng dịch thứ 4 . Giai đoạn 2 là giai đoạn dịch bùng phát đột ngột, tâm điểm là tại thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam vẫn tiếp tục phong tỏa để làm chậm tốc độ lây lan dịch đồng thời với việc xây dựng, điều chỉnh hệ thống điều trị đáp ứng được với số lượng bệnh nhân lớn, đẩy nhanh tốc độ tiêm vắc xin.

* Vắc xin COVID-19 tại Việt Nam




**Hình 1. 3. Thông tin về vắc xin COVID-19 tại Việt Nam**

*(Theo số liệu Chương trình Tiêm chủng quốc gia)*

Số lượng vắc xin đã tiếp nhận tại Việt Nam bao gồm từ 4 nguồn khác nhau, trong đó từ nguồn Ngân sách nhà nước chiếm tỷ lệ cao nhất 41,9%; COVAX là 27,0%, chính phủ các nước 20,9% và từ các nguồn tài trợ trong nước là 10,2%.

Việt Nam đã tiếp nhận và cấp phép sử dụng khẩn cấp (EUA) 9 loại vắc xin: AstraZeneca (25,2%), Pfizer (42,6%), Moderna (9%), Johnson & Johnson (Janssen), Sinopharm BIBP (20,3%), Sputnik V, Hayat-Vax COVID-19,

Abdala và gần đây là Covaxin sản xuất bởi Công ty Bharat Biotech International Limited, Ấn Độ.

Việt Nam bắt đầu chiến dịch tiêm chủng vắc xin COVID-19 từ tháng 3 năm 2021. Các loại vắc xin được sử dụng chủ yếu trong chiến dịch bao gồm:

- **AstraZeneca** (là loại vắc xin đầu tiên được phê duyệt và triển khai tại Việt Nam).
- **Pfizer-BioNTech**
- **Moderna**
- **Sinopharm** (từ Trung Quốc)
- **Sputnik V** (từ Nga)

Trong những giai đoạn đầu, ưu tiên tiêm chủng được dành cho các nhóm đối tượng có nguy cơ cao, bao gồm nhân viên y tế, lực lượng tuyến đầu chống dịch, người cao tuổi và những người có bệnh nền. Sau đó, chiến dịch mở rộng để tiêm cho toàn bộ dân số từ 12 tuổi trở lên.

Triển khai tiêm chủng vắc xin COVID-19 tại Việt Nam (đến ngày 29/5/2023): Tổng số mũi tiêm trên toàn quốc: 266.408.987 mũi tiêm, trong đó:

| | |
|---|---|
| Nhóm từ 18 tuổi trở lên: | - Liều cơ bản đã đạt 100% |
| | - Mũi 3: 52.133.593 (81,8%) |
| | - Mũi 4: 17.898.456 (80,3%) |
| Nhóm từ 12-17 tuổi: | - Liều cơ bản đã đạt 100% |
| | - Mũi 3: 5.813.288 (69,3%) |
| Nhóm từ 5-11 tuổi: | - Mũi 1: 10.227.846 (92,6%) |
| | - Mũi 2: 8.474.544 (76,7%) |

Trải qua hơn 3 năm đại dịch COVID-19, cùng với công bố của TCYTTG ngày 5/5/2023 về đại dịch COVID -19 không còn được coi là tình trạng khẩn cấp về sức khỏe cộng đồng gây quan ngại quốc tế , Bộ Y tế Việt Nam đã ra quyết định số 3896/QĐ-BYT từ 20/10/2023, COVID-19 không còn là bệnh truyền nhiễm nhóm A mà chuyển sang thuộc nhóm B của Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm năm 2007. Theo đó, các biện pháp phòng chống dịch cũng được điều chỉnh phù hợp với bệnh truyền nhiễm nhóm B [5, 133].

Trong thời gian qua, Việt Nam đạt được kết quả tốt trong việc kiểm soát sự gia tăng các ca nặng, nhập viện và tử vong nhờ tỷ lệ tiêm chủng ở mức cao. Tuy nhiên, hiệu quả bảo vệ của vắc xin có thể giảm dần theo thời gian. Do đó, TCYTTG đã khuyến nghị tích hợp vắc xin phòng COVID-19 vào Chương trình tiêm chủng Quốc gia cho nhóm nguy cơ cao. Trong thời gian tới, chúng ta vẫn cần duy trì việc kiểm soát COVID-19. Các biện pháp phòng ngừa như đeo khẩu trang, rửa tay thường xuyên ... vẫn là cách hiệu quả để giảm sự lây lan của virus. Bên cạnh đó cần tăng cường năng lực xét nghiệm và theo dõi tiếp xúc để phát hiện sớm và cách ly các trường hợp nhiễm bệnh.

## 1.2. SARS-COV-2

### *1.2.1. Phân loại*

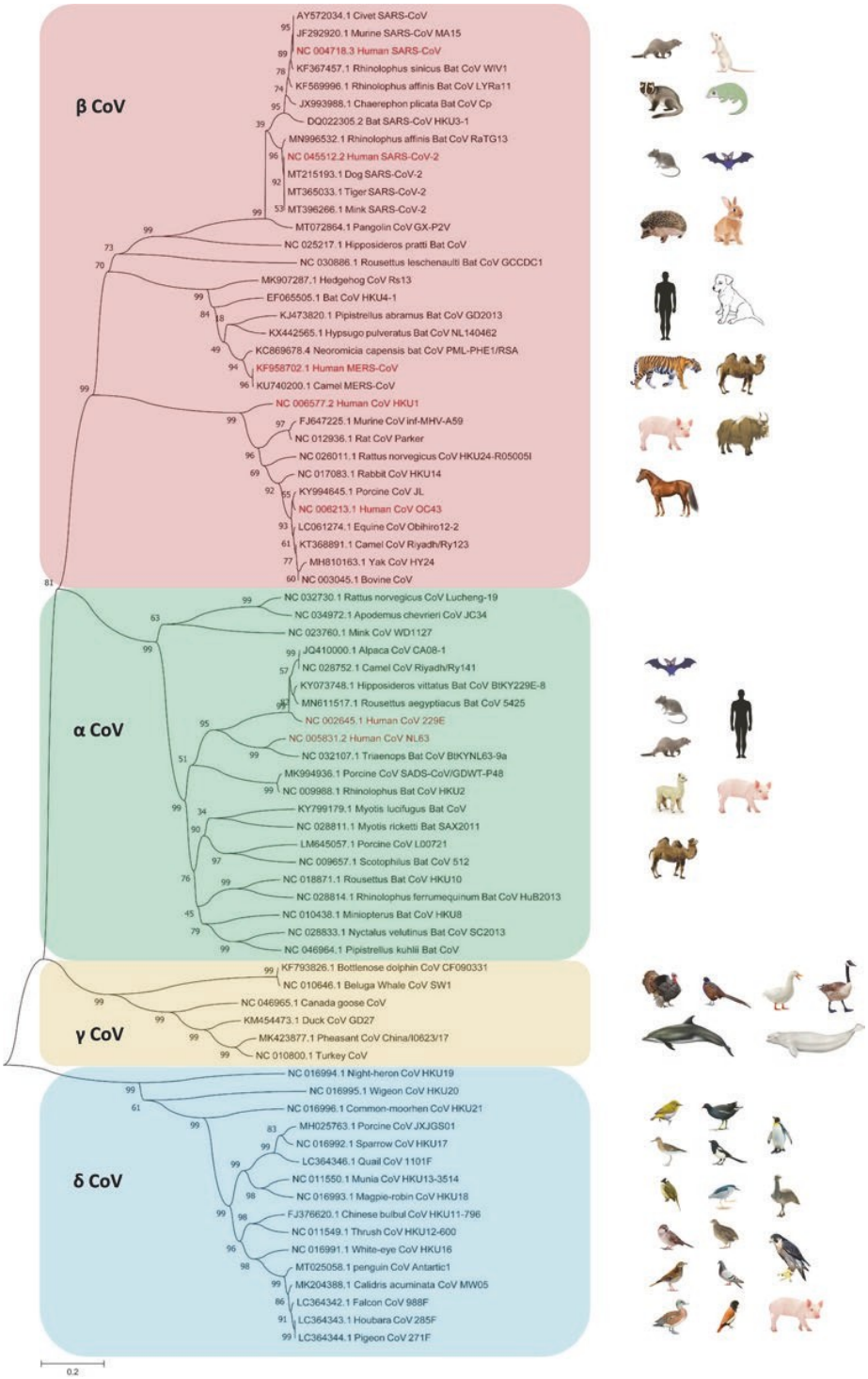
Coronavirus là một nhóm các virus RNA có vỏ bọc được phân loại thành bốn nhóm dựa trên phân nhóm phát sinh chủng loài, thuộc bộ *Nidovirales*, họ *Coronaviridae,* phân họ *Coronavirinae* [9]. Theo quy định của Ủy ban Quốc tế về Phân loại virus (ICTV), bốn nhóm coronavirus này được xếp thành bốn chi:

+ Chi *Alphacoronavirus*: HCoV-229E và HCoV-NL63.

+ Chi *Betacoronavirus*: HCoV-HKU1, HCoV-OC43, và SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2.

+ Chi *Gammacoronavirus* và *Deltacoronavirus*: gây bệnh cho chim và động vật (gà tây, ngựa), phần lớn các bệnh đều nhẹ, có liên quan đến bệnh thần kinh, gan, tiêu hoá và hô hấp.

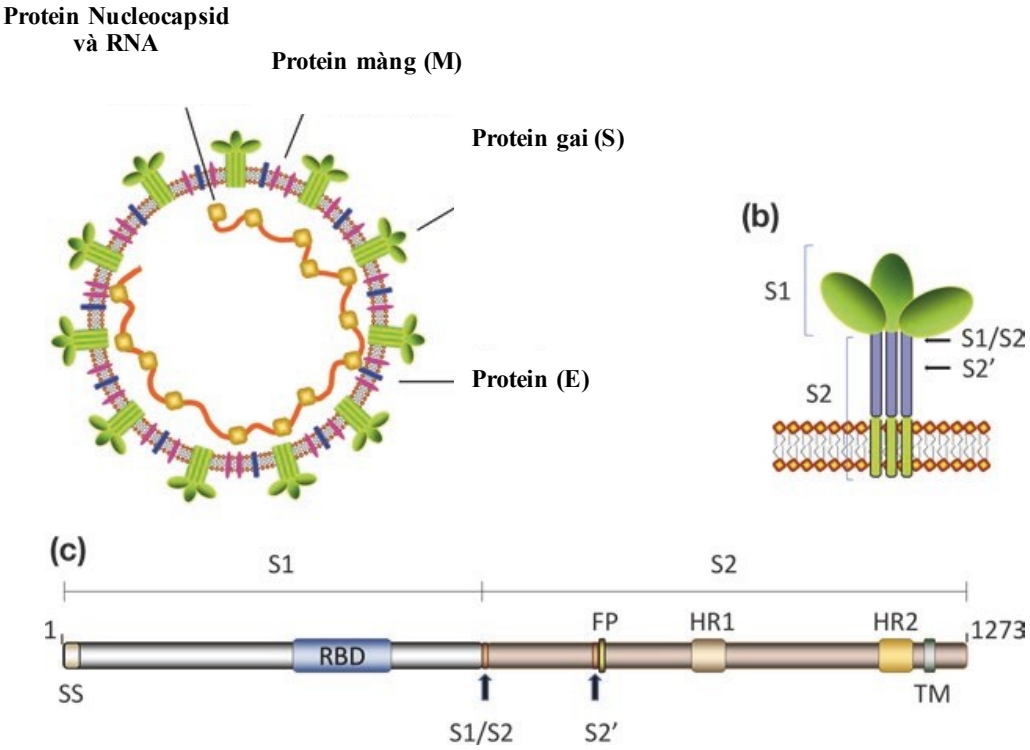
Đến nay, trên thế giới virus thuộc chi *Alphacoronavirus* và *Betacoronavirus* gây bệnh trên người ghi nhận 7 virus: 4 coronavirus gây bệnh với triệu chứng nhẹ 229E, NL63, HKU1, OC43 và 3 coronavirus gây triệu chứng đường hô cấp tính nặng: SARS-CoV-2003, MERS-CoV (2012) và SARS-CoV-2 (2019). SARS-CoV-2003 với 8.000 ca mắc (774 tử vong) tại 37 nước [12] và hội chứng viêm đường hô hấp vùng Trung Đông MERS-CoV (2012) với 2.494 ca mắc (858 tử vong) [128]. SARS-CoV-2 được phát hiện tại thành phố Vũ Hán, Trung Quốc vào tháng 12/2019 và vẫn tiếp tục gây đại dịch trên thế giới cho đến nay.




**Hình 1. 4. Phân loại Coronavirus [50]**

*Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ các trình tự gene RdRp của 76 chủng coronavirus, phân thành bốn chi (α, β, γ, δ). Coronavirus có nguồn gốc từ các vật chủ khác nhau (hình bên phải). Coronavirus ở người (SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HKU1, OC43, 229E, NL63) được biểu thị bằng màu đỏ.*

*1.2.2. Hình thái, cấu trúc và hệ gen SARS-CoV-2*




**Hình 1. 5. Cấu trúc SARS-CoV-2 và protein gai (S) [50]**

*(a) Sơ đồ thể hiện hệ gen SARS-CoV-2 và bốn loại protein cấu trúc chính: protein gai (S), protein E, protein màng (M) và protein nucleocapsid (N). (b) Sơ đồ cấu trúc trimer protein gai (S). (c) Biểu diễn dạng đường của monomer protein gai (S).*

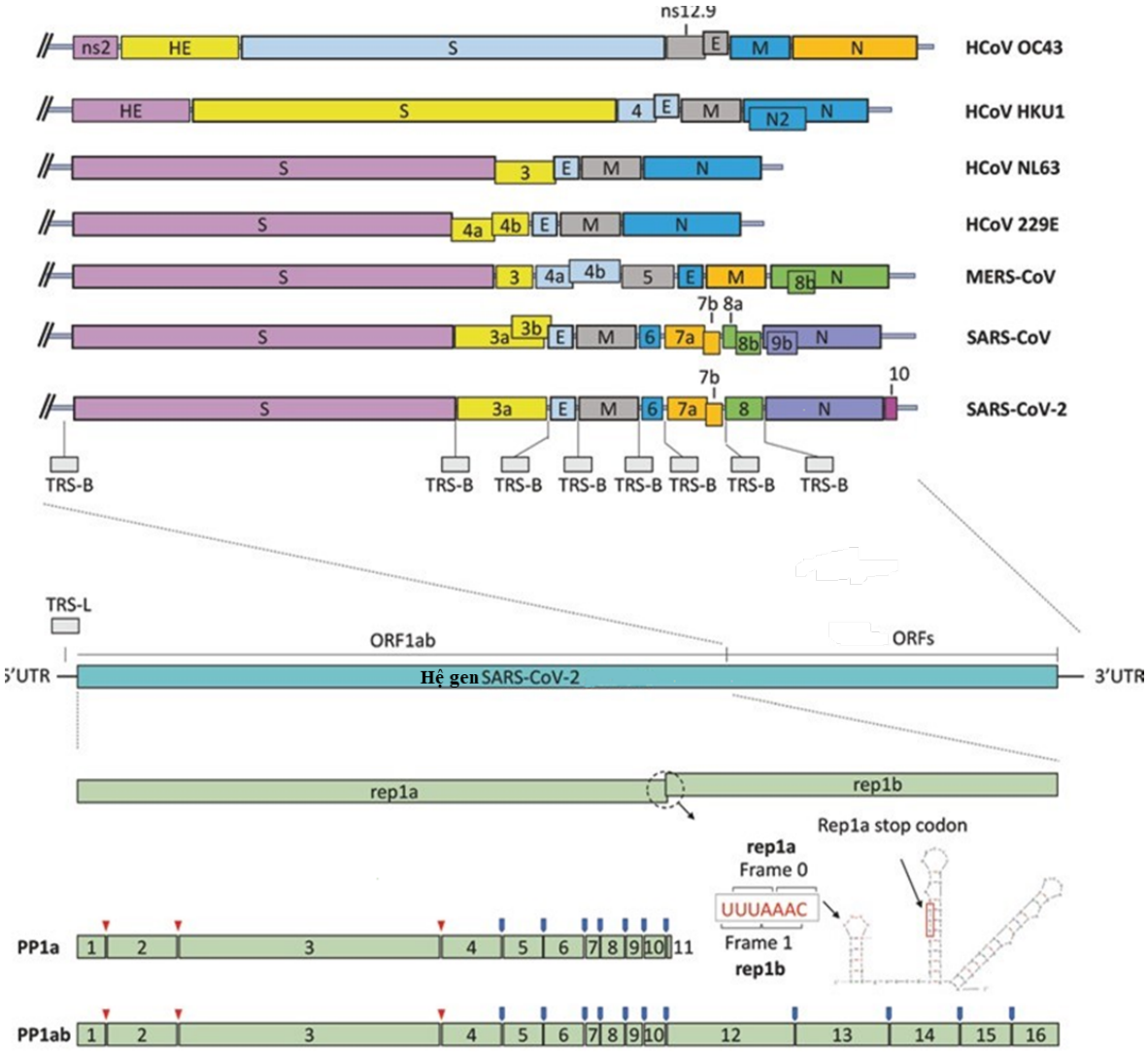
Giống như các coronavirus khác, các virion của SARS-CoV-2 có dạng tương tự hình cầu hoặc có tính đa hình, đường kính từ 80 đến 160 nm. Hạt virus có hình dạng giống như một vương miện dưới kính hiển vi điện tử, được bao bọc bởi lipid và có protein gai trên bề mặt màng bên ngoài (Hình 1.5). Nucleocapsid được đóng gói trong lớp lipid kép và được hình thành từ axit nucleic và protein nucleocapsid [68, 82, 119].

SARS-CoV-2 là virus RNA sợi đơn dương, không phân đoạn. Hệ gen của

SARS-CoV-2 có kích thước xấp xỉ 30 kb và hệ gen của hCoVs là hệ gen lớn nhất trong số tất cả các virus RNA [42, 134]. Hệ gen của hCoVs có cấu trúc được bảo toàn, bao gồm một hệ gen cơ bản là 5′-replicase-structure proteins-3’ (Hình 1.6), và có thể được sử dụng để tạo ra một RNA dẫn đường (gRNA – là một đoạn RNA có chức năng dẫn đường cho các enzym gắn với RNA tại phức hợp) và các RNA dẫn đường sợi đơn phụ trợ khác (sgRNAs). Các mRNA đều có cấu trúc đầu 5'-methyl-cap, đuôi 3' poly A, và các khung đọc mở (ORF) ở giữa. Ở đầu 5 ′ hai phần ba hệ gen chứa ORF1a và 1b. ORF1a và ORF1b đều có nguồn gốc từ gRNA, mã hóa cho polyprotein 1a (PP1a) và polyprotein 1b (PP1ab). Protein PP1a và PP1ab trải qua quá trình phân cắt sẽ được dịch mã bằng các protease giải mã virus và protease chính (Mpro, 3CLpro) tạo thành 16 protein không cấu trúc lần lượt từ nsp1 đến nsp16 [51, 52, 122]. Ở đầu 3’ một phần ba hệ gen chứa các ORF riêng biệt, có nguồn gốc từ các sgRNA khác nhau, mã hóa cho các protein cấu trúc và protein phụ.

Các protein cấu trúc chính của SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-229E và HCoV-NL63 bao gồm 5’-S-E-M-N-3 ′ và HCoV-HKU1 và HCoV-OC43 chứa 5’-HE-S-E-M-N-3 ′[100].

Các protein phụ của SARS-CoV là 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b và 9b trong khi đó của SARS-CoV-2 là 3a, 6, 7a, 7b, 8 và 10 [65]




**Hình 1. 6. Hệ gen và các sản phẩm protein của SARS-CoV-2 [50]**

*Sơ đồ hệ gen hoàn chỉnh của SARS-CoV-2 (NC_045512.2) [50]*

**Bảng 1. 2. Vai trò các protein không cấu trúc của SARS-CoV-2 [49]**

| Protein | Số axit amin | Vai trò / chức năng |
|---|---|---|
| Nsp1 | 180 | Hỗ trợ virus trốn tránh hệ miễn dịch |
| Nsp2 | 638 | Yếu tố cần thiết cho sự nhân lên của virus |
| Nsp3 | 1945 | Tạo thành phức hợp protein sao chép-phiên mã |
| Nsp4 | 500 | Có vai trò đối với quá trình sao chép RNA |
| Nsp5 | 306 | Là một protease 3-chymotrypsin-like (3CLpro), ảnh hưởng đến sự nhân lên của virus |
| Nsp6 | 290 | Có vai trò đối với quá trình sao chép RNA |
| Nsp7 | 83 | Góp phần hình thành gen RdRp (RNA dependent RNA polymerase). |
| Nsp8 | 198 | |
| Nsp9 | 113 | Tham gia vào quá trình sao chép RNA virus, liên quan đến cơn bão cytokine và làm tăng tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân COVID-19 |
| Nsp10 | 139 | Làm tăng sản xuất cả IL-8 và IL-6, gây phản ứng viêm tương tự như nsp9 |
| Nsp11 | 13 | Chưa rõ chức năng |
| Nsp12 | 932 | Là enzym chính thực hiện việc sao chép RNA của virus |
| Nsp13 | 601 | Vai trò trong quá trình sao chép và phiên mã |
| Nsp14 | 527 | Vai trò của Exoribonuclease, cắt các polyprotein |
| Nsp15 | 346 | Vai trò của Endoribonuclease, cắt các liên kết RNA trong chuỗi RNA đơn |
| Nsp16 | 298 | Vai trò trong quá trình phiên mã |

Gen S mã hóa protein cấu trúc bề mặt có trọng lượng 141,20 kDa bao gồm 1273 axit amin [48]. Protein gai có dạng monome sẽ trải qua một quá trình từ oligome hoá đến trime hóa, cùng với quá trình glycosyl hóa (carbohydrate được gắn vào protein trong quá trình dịch mã), giúp mở rộng kích thước phân tử monome lên khoảng 250 kDa [92, 107]. Protein S hoàn chỉnh bao gồm 2 vùng S1 và S2 (Hình 1.5b). S1 chịu trách nhiệm gắn kết với thụ thể tế bào chủ, S2 thúc đẩy sự hòa màng giữa virion và tế bào chủ [31, 143].

Gen E mã hóa một protein xuyên màng 8,37 kDa bao gồm 75 axit amin [15]. Đây là protein với cấu trúc virion nhỏ nhất, tương đồng 94,74% với SARS-CoV. Chức năng gen E của SARS-CoV-2 chưa được biết đến, mặc dù trong SARS-CoV, protein E cùng với protein M và protein N là cần thiết để lắp ráp và giải phóng virus ra khỏi tế bào vật chủ [19].

Protein M là một protein xuyên màng 25,15 kDa bao gồm 222 axit amin, đóng vai trò quan trọng trong sự lắp ráp virus [74, 137].

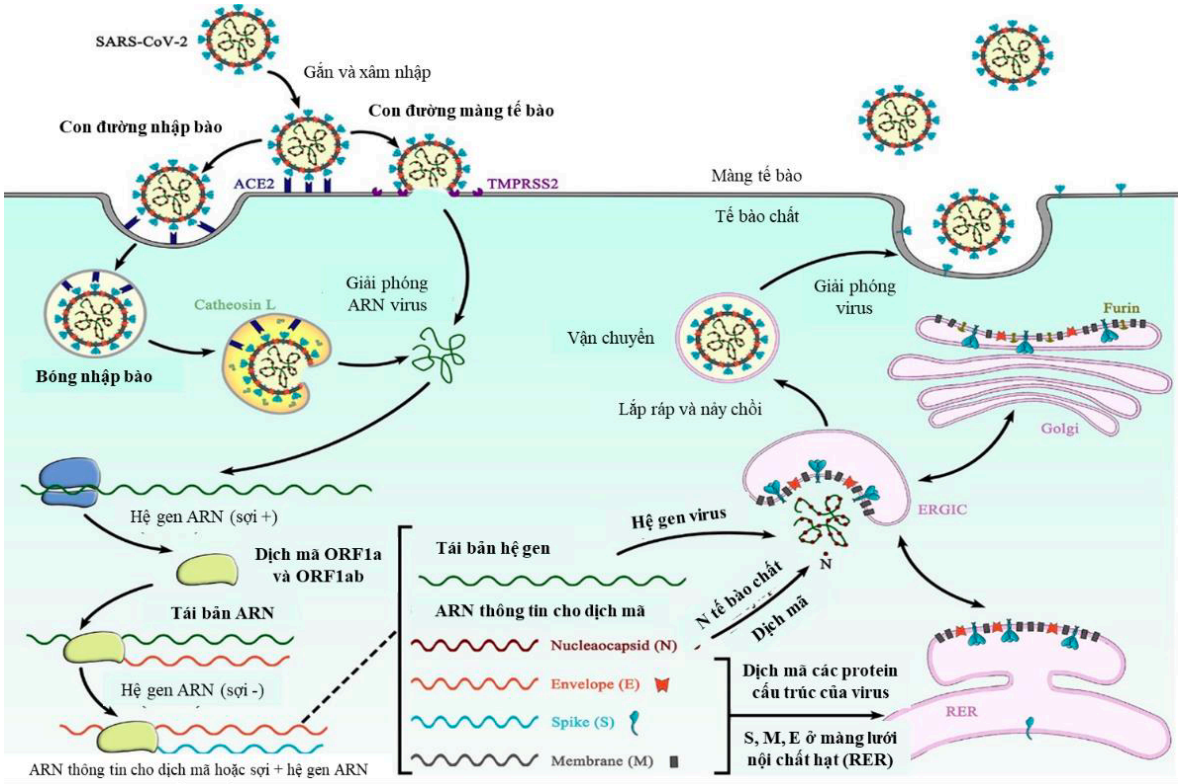
Protein nucleocapsid N là một protein 45,64 kDa bao gồm 419 axit amin, Protein N liên kết với hệ gen RNA để tạo thành nucleocapsid. Tham gia vào quá trình điều hòa tổng hợp RNA của virus và có thể tương tác với protein M trong quá trình nảy chồi của virus [36, 99].

Các glycoprotein hemagglutinin-esterase (HE) chỉ được tìm thấy trong các *Betacoronavirus*, HCoV-OC43 và HKU1. Hợp chất hemagglutinin liên kết với neuraminic acid trên bề mặt tế bào chủ, có thể cho phép sự bám dính ban đầu của virus vào màng. Các gen HE của coronavirus có trình tự tương đồng với trình tự với glycoprotein của virus cúm C.

SARS-CoV-2 có sáu protein phụ (3a, 6, 7a, 7b, 8 và 10) trong khi đó SARS-CoV có tám protein phụ (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b và 9b). Nghiên cứu trước đây về SARS-CoV cho thấy các protein phụ không đóng vai trò bắt buộc trong quá

trình sao chép RNA, trong khi một số protein phụ có liên quan đến cơ chế bệnh sinh của virus thông qua việc điều hòa các con đường của tín hiệu interferon và sản xuất các cytokine gây viêm [68]. Mặc dù chức năng của các protein phụ SARS-CoV-2 vẫn chưa rõ ràng, những nghiên cứu về protein virus đã chứng minh rằng một số protein này có thể tương tác với các protein của vật chủ, cung cấp cái nhìn sâu hơn về vai trò của chúng trong vòng đời của virus [113, 137].

### *1.2.3. Quá trình nhân lên của SARS-CoV-2*




**Hình 1. 7. Quá trình nhân lên của SARS-CoV-2 trong tế bào vật chủ [37]**

Khi SARS-CoV-2 tiếp cận tế bào đích, chu kỳ lây nhiễm bắt đầu bằng quá trình bám dính và xâm nhập, quá trình này được thực hiện nhờ tương tác của các glycoprotein S với thụ thể ACE2 và tiến hành hòa màng sau đó [76, 107, 114]. Liên kết của vùng protein S1 và thụ thể ACE2 ái lực cao trong giai đoạn nhập bào của virus, từ đó hình thành một túi chứa virus có màng kép. Sau đó là sự phân cắt vùng protein S2 thông qua protease lysosome cathepsin L và

protease serine TMPRSS2 của tế bào vật chủ, nhằm định vị và gắn với ACE2. Quá trình phân cắt này tách S1 và S2, sau đó tạo điều kiện cho sự tái sắp xếp cấu trúc S2 thực hiện phản ứng tổng hợp peptide trong vùng protein S2. Peptide sau đó xuyên qua màng tế bào, khởi đầu cho quá trình hòa màng giữa virus vào nội bào và sau đó là giải phóng lõi virus vào tế bào [67].

Sau khi vào tế bào chất, hệ gen RNA của SARS-CoV-2 đầu tiên sẽ được dịch mã tổng hợp các protein ORF1a và ORF1ab để tạo thành phức hệ tái bản RNA của virus [147]. Mặt khác, RNA sợi (-) tạo ra trong quá trình tái bản được sử dụng để phiên mã các đoạn mRNA, sau đó dịch mã tạo nên các protein cần thiết cho virus. Trong đó, protein N được tổng hợp ở tế bào chất và liên kết với RNA sợi (+) tạo nên phức nucleocapsid. Các protein còn lại bao gồm protein S, protein M và protein E được dịch mã bởi các ribosome nằm trên lưới nội chất hạt và trải qua quá trình biến đổi sau dịch mã ở lưới nội chất, bộ máy Golgi. Tại bộ máy Golgi, protein S của virus sẽ bị cắt dưới tác dụng của furin tạo thành tiểu phần S1 và S2. Các bóng vận chuyển trung gian (ERGIC) cùng với các protein S, M, E và các protein khác lắp ráp với phức hệ nucleocapsid trong tế bào chất và tạo thành các bóng vận chuyển mang virus để đưa các virion trưởng thành ra khỏi tế bào vật chủ [16, 37, 106].

## 1.3. BIẾN THỂ SARS-COV-2

Tất cả các virus, bao gồm cả SARS-CoV-2 gây đại dịch COVID-19, đều thay đổi theo thời gian. Hầu hết các thay đổi ít hoặc không ảnh hưởng đến đặc tính của virus. Tuy nhiên, một số thay đổi có thể ảnh hưởng đến đặc tính của virus, như mức độ lây lan dễ dàng, mức độ nghiêm trọng của bệnh liên quan hoặc hiệu quả của vắc xin, thuốc điều trị, công cụ chẩn đoán hoặc các biện pháp xã hội và sức khỏe cộng đồng khác.

TCYTTG phối hợp với chính quyền các quốc gia, các nhà nghiên cứu tiến hóa virus và mạng lưới phòng thí nghiệm tham chiếu COVID-19 đại diện từ GISAID, Nextstrain, Pango theo dõi và đánh giá sự tiến triển của SARS-CoV-2 kể từ tháng 1 năm 2020. Vào cuối năm 2020, sự xuất hiện của các biến thể gây tăng nguy cơ đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu đã thúc đẩy việc mô tả đặc điểm của các Biến thể Quan tâm (VOI) và các Biến thể Quan ngại (VOC), nhằm ưu tiên theo dõi và nghiên cứu trên toàn cầu, để có những đáp ứng phù hợp đối với đại dịch COVID-19 [23].

**Tiêu chí phân loại các biến thể**

Các biến thể SARS-CoV-2 được phân loại dựa trên một số tiêu chí:

- Tốc độ lây lan: Biến thể có thể lây nhiễm nhanh hơn so với các biến thể trước đó.
- Mức độ nghiêm trọng của bệnh: Biến thể gây ra các triệu chứng nặng hơn hoặc làm tăng tỷ lệ tử vong.
- Khả năng né tránh miễn dịch: Biến thể có thể làm giảm hiệu quả của các biện pháp miễn dịch, bao gồm vắc xin và miễn dịch tự nhiên.
- Khả năng kháng thuốc: Một số biến thể có khả năng kháng lại các phương pháp điều trị bằng kháng thể đơn dòng hoặc thuốc kháng virus.

**Biến thể quan tâm - Variants of Interest (VOIs)**

- Với những thay đổi di truyền được dự đoán hoặc biết là có ảnh hưởng đến các đặc điểm của virus như khả năng lây truyền, mức độ nghiêm trọng của bệnh, trốn thoát miễn dịch, giảm hiệu quả chẩn đoán hoặc điều trị; VÀ
- Được xác định là nguyên nhân gây ra lây truyền cộng đồng hoặc nhiều cluster COVID-19, ở nhiều quốc gia với số trường hợp gia tăng theo thời

gian, hoặc các tác động dịch tễ học rõ ràng khác cho thấy một nguy cơ mới đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu.

**Bảng 1. 3. Biến thể quan tâm - Variants of Interest (VOIs) [43]**

| Phân loại biến thể/dòng | | | | Quốc gia ghi nhận đầu tiên | Thời gian |
|---|---|---|---|---|---|
| **TTYTTG** | **Pangolin** | **GISAID** | **Nextstrain** | | |
| Eta | B.1.525 | G/484K.V3 | 21D | Nhiều nước, 12/2020 | 17/03/2021 |
| Iota | B.1.526 | GH/253G.V1 | 21F | Hoa Kỳ, 11/2020 | 24/03/2021 |
| Kappa | B.1.617.1 | G/452R.V3 | 21B | Ấn Độ, 10/2020 | 4/4/2021 |
| Lamda | C.37 | GR/452Q.V1 | 21G | Peru, 12/2020 | 14/6/2021 |

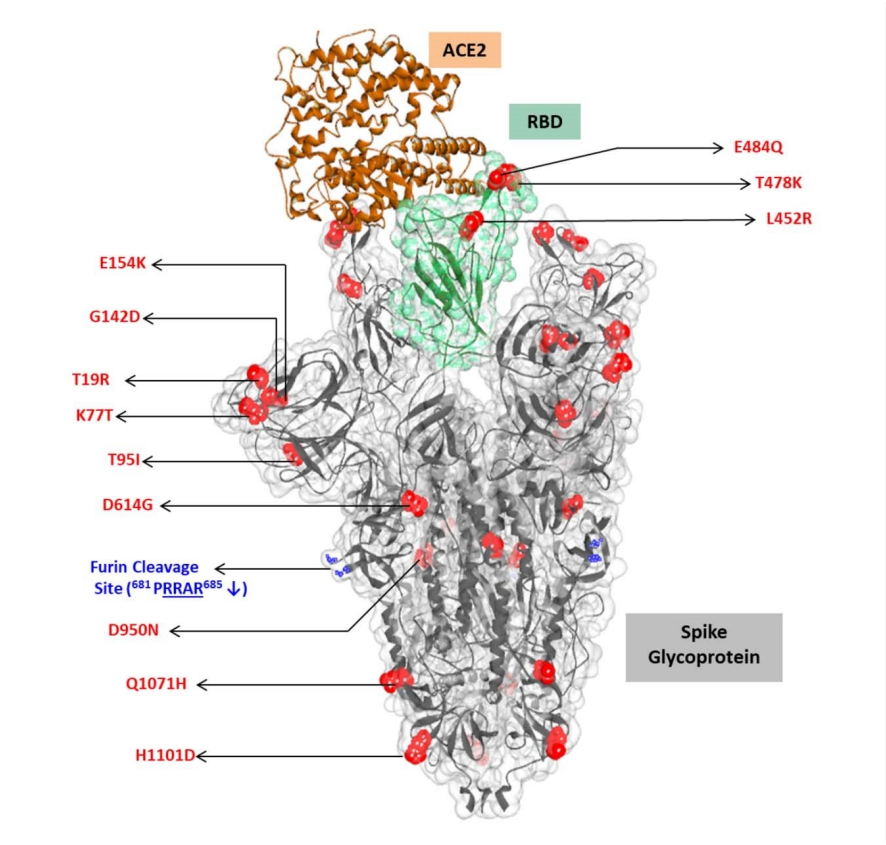
**Biến thể quan ngại - (Variants of Concern -VOCs)**

Biến thể SARS-CoV-2 đáp ứng định nghĩa của những biến thể quan tâm (Variants of Interest – VOI) và thông qua đánh giá so sánh, đã được chứng minh là có liên quan đến một hoặc nhiều thay đổi sau đây ở mức độ có ý nghĩa đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu:

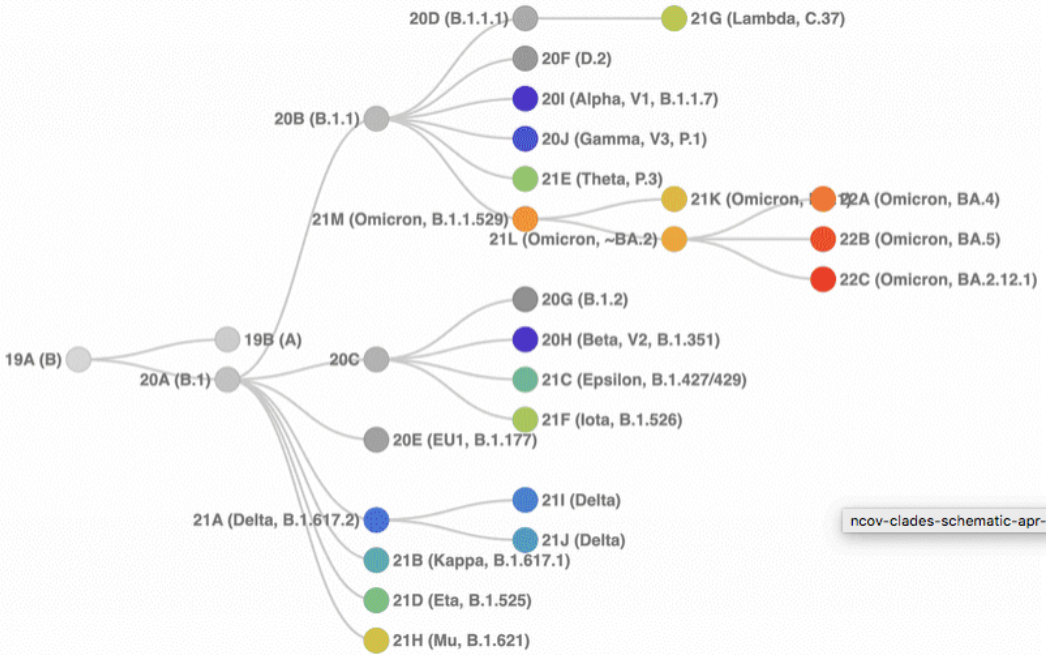
- Tăng khả năng lây truyền hoặc thay đổi bất lợi trong dịch tễ học COVID-19; HOẶC
- Tăng độc lực hoặc thay đổi biểu hiện bệnh lâm sàng; HOẶC
- Giảm hiệu quả của các biện pháp xã hội và sức khỏe cộng đồng hoặc trong phương pháp chẩn đoán, điều trị, vắc xin sẵn có.

**Bảng 1. 4. Biến thể quan ngại - (Variants of Concern -VOCs) [25, 105]**

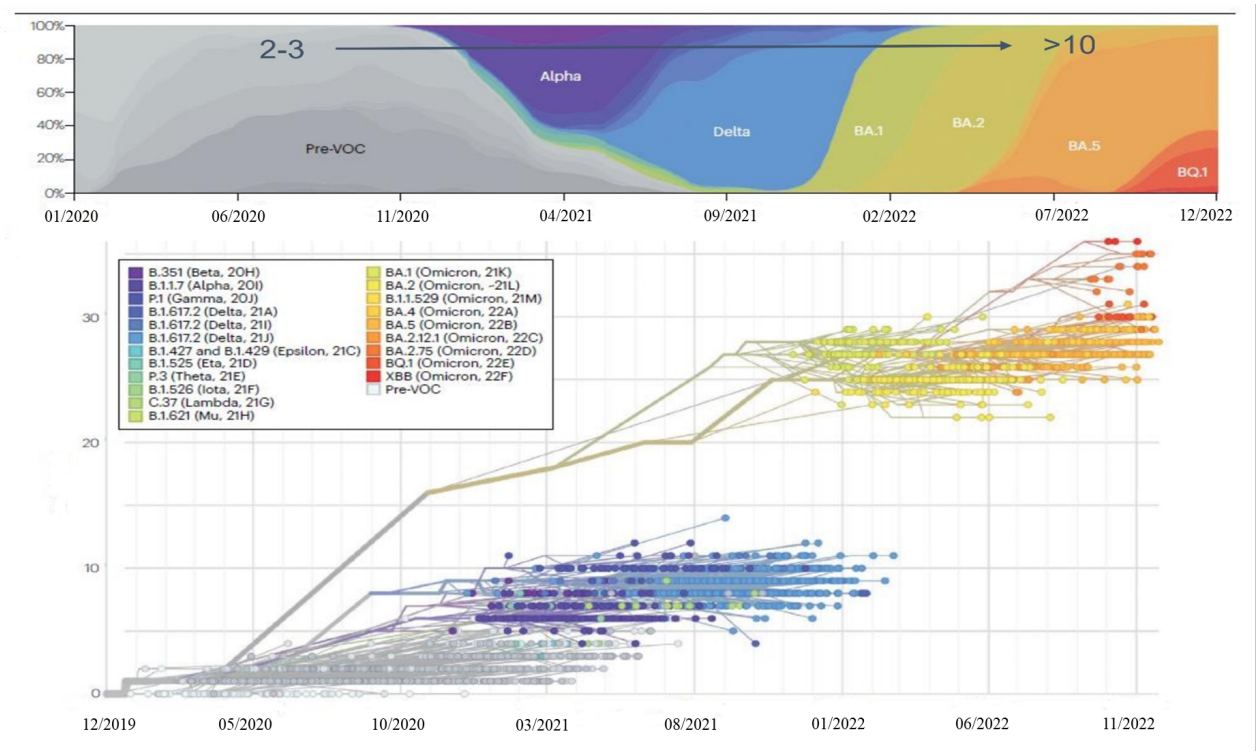
| Phân loại biến thể/dòng | | | | Axit amin thay đổi | Quốc gia ghi nhận đầu tiên | Thời gian |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **TTYTTG** | **Pango** | **GISAID** | **Nextstrain** | | | |
| Alpha | B.1.1.7 | GRY | 20 I(V1) | +S: 484K<br>+S: 452R | Anh, 9/2020 | 18/12/2020 |
| Beta | B.1.351<br>B.1.351.2<br>B.1.351.3 | GH/501Y.V2 | 20 H (V2) | +S: L18F | Nam Phi, 5/2020 | 18/12/2020 |
| Gamma | P.1<br>P.1.1<br>P.1.2 | GH/501Y.V3 | 20 J (V3) | +S: 681H | Brazil, 11/2020 | 11/1/2021 |
| Delta | B.1.617.2<br>AY.1<br>AY.2 | G/478K.V1 | 21A, 21I, 21J | +S: 417N | Ấn Độ, 10/2020 | VOI: 4/4/2021<br>VOC: 11/5/2021 |
| Omicron | B.1.1.529<br>BA.2<br>BA.3<br>BA.4<br>BA.5 | | 21M, 21L,21K 22A, B, C | +S: 32 axit amin | Nam Phi 11/2021 | VOC: 26/11/2021 |




**Hình 1. 8. Các điểm đột biến chính trên cấu trúc tinh thể của protein S trong phức hợp vùng gắn thụ thể ACE2 [24]**




**Hình 1. 9. Phân loại các biến thể theo Nextstrain 2022 [85]**

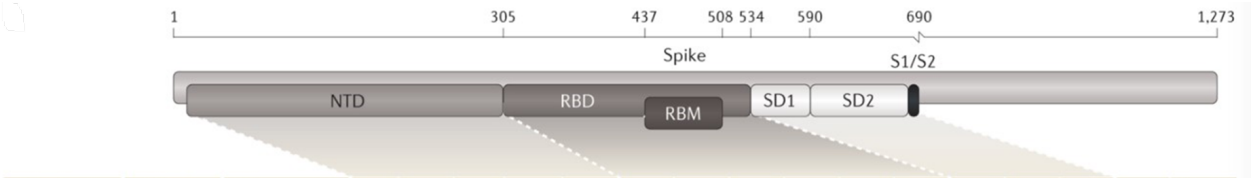



**Hình 1. 10. Biến thể SARS-CoV-2 lưu hành theo thời gian và các đột biến axit amin trên protein S1 [73]**

Sau khi SARS-CoV-2 lần đầu tiên xuất hiện trên người, trong gần 8 tháng đầu tiên, SARS-CoV-2 dường như có tốc độ tiến hoá chậm. Điều này một phần là do số lượng virus trên toàn cầu tương đối nhỏ, trong khi sự lây truyền vẫn chưa phổ biến. Những yếu tố này, cùng với khả năng đọc sửa enzyme polymerase của SARS-CoV-2 khiến người ta kỳ vọng rằng SARS-CoV-2 sẽ tiến hoá chậm và sự tiến hoá đó sẽ không đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát đại dịch. Tháng 4/2020, với sự thay thế D164G trên protein S là sự thay đổi đáng chú ý nhất, đột biến được cho là tăng khả năng lây nhiễm và lan truyền SARS-CoV-2 [127, 128]. Trong khoảng thời gian này, tỷ lệ thay thế ước tính của SARS-CoV-2 đã giảm gần 50%. Đây là kết quả của quá trình chọn lọc không đầy đủ, trong khoảng thời gian ngắn để lại các đột biến không có lợi trong quần thể virus. Hiện tượng này có thể là nguyên nhân làm thay đổi tỷ lệ

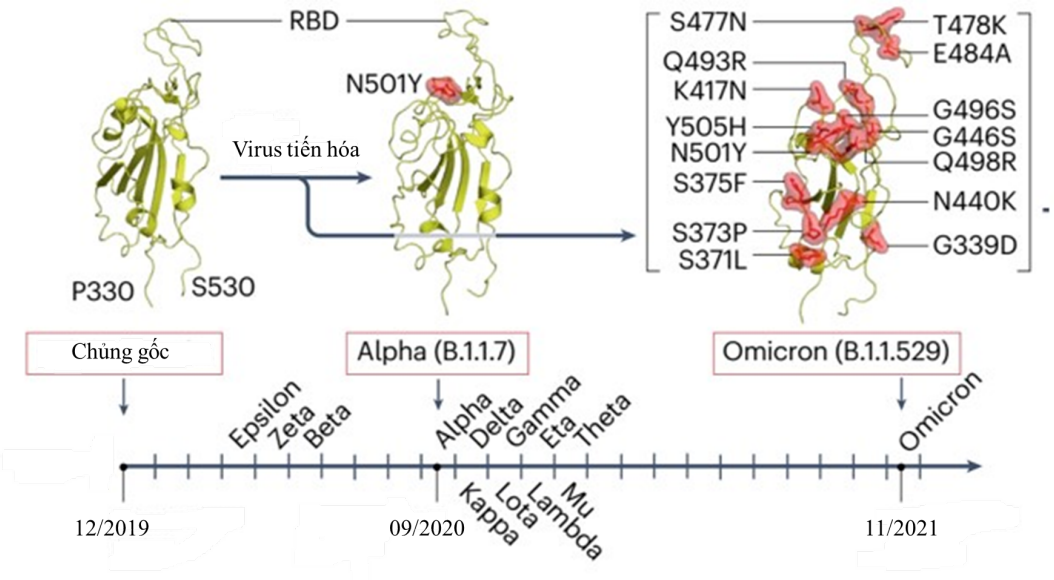
ước tính các biến thể SARS-CoV-2 trong giai đoạn tiếp theo của đại dịch [40, 44, 78].

A




| WHO | Biến thể Pangolin | Phát hiện đầu tiên tại | 18 | 69 | 95 | 144 | 242 | 417 | 452 | 478 | 484 | 490 | 501 | 614 | 681 | 701 | nsp6: 106 | N:203/ 204 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | L | H | T | Y | L | K | L | T | E | F | N | D | P | A | S | R/G |
| Alpha | B.1.1.7 | UK | | del | | del | | | | | | | Y | G | H | | del | K/R |
| Beta | B.1.351 | South Africa | F | | | | del | N | | | K | | Y | G | | V | del | |
| Gamma | P.1 | Brazil | F | | | | | T | | | K | | Y | G | | | del | K/R |
| Delta | B.1.617.2 | India | | | I | | | | R | K | | | | G | R | | | M |
| Epsilon | B.1.427/9 | USA | | | | | | | R | | | | | G | | | | |
| Eta | B.1.525 | Nigeria | | del | | del | | | | | K | | | G | | | del | |
| Theta | P.3 | Philippines | | | | | | | | | K | | Y | G | H | | | K/R |
| Iota | B.1.526 | USA | | | I | del | | | | | K | | | G | | V | del | |
| Kappa | B.1.617.1 | India | | | I | | | | R | | Q | | | G | R | | | M |
| Zeta | P.2 | Brazil | | | | | | | | | K | | | G | | | | K/R |
| Lambda | C.37 | Peru | | | | | | | Q | | | S | | G | | | del | K/R |

B




**Hình 1. 11. Các đột biến điển hình trên protein S ở các biến thể SARS-CoV-2 [62, 141]**

Sau 8 tháng, các biến thể SARS-CoV-2 khác nhau xuất hiện, đánh dấu một bước ngoặt của đại dịch theo quan điểm tiến hoá. Ba biến thể Alpha, Beta và Gamma xuất hiện độc lập tại các khu vực khác nhau trên thế giới như tại Châu Âu (Anh), Châu Phi (Nam Phi) và Nam Mỹ (Brazil). Số lượng đột biến liên quan đến các biến thể mới xuất hiện Alpha và Beta lần lượt là 23 và 13 axit amin [53, 83, 123], trong khi đến biến thể Omicron thì số lượng này đột biến xuất hiện trên protein S là 26-32 axit amin [39, 135]. Những quan sát này dường như được tạo ra để thích ứng với việc nhân lên trong quá trình lây nhiễm mãn tính, cho phép virus có nhiều thay đổi tiến hoá.

**Biến thể Alpha** có khả năng lây truyền cao hơn khoảng 43-82% so với biến thể SARS-CoV-2 ban đầu [29]. Điều này được cho là do các đột biến quan trọng trong protein gai S của virus, đặc biệt là đột biến **N501Y**, giúp virus gắn kết chặt chẽ hơn với thụ thể ACE2 trên tế bào người. Kết quả là virus dễ xâm nhập và gây nhiễm hơn, từ đó làm gia tăng tốc độ lây lan trong cộng đồng. Biến thể Alpha có thể làm tăng nguy cơ nhập viện và tăng nguy cơ tử vong 55% so với biến thể gốc [30]. Các vắc xin vẫn có hiệu quả cao trong việc ngăn ngừa bệnh nặng và tử vong do biến thể Alpha, nhưng có thể giảm nhẹ đối với các triệu chứng nhẹ hoặc nhiễm không triệu chứng [140].

**Biến thể Delta (B.1.617)** được phát hiện đầu tiên tại Ấn Độ (từ tháng 10/2020), sau đó lan ra các nước trong khu vực và trên thế giới (tháng 12/2020), trở thành biến thể lưu hành rộng mang các đột biến tạo ưu thế cho sự lây truyền trong quần thể là các đột biến D614G, L452R, P681R, and T478K trên protein S [24]. Biến thể Delta có khả năng lây lan cao nhất trong số các biến thể SARS-CoV-2 đã xuất hiện cho đến nay, biến thể Delta có mức độ lây truyền cao hơn biến thể Alpha 40-60% gây nguy cơ nguy cơ tăng nặng bệnh, tăng khả năng nhập viện và tử vong, đặc biệt ở những người chưa tiêm vắc xin [22, 126]. Mặc dù hiệu quả của vắc xin đối với biến thể Delta có thể giảm, đặc biệt là trong việc

ngăn ngừa nhiễm bệnh có triệu chứng, vắc xin vẫn cung cấp bảo vệ mạnh mẽ chống lại bệnh nặng, nhập viện và tử vong, nhất là sau khi tiêm đủ liều hoặc mũi tăng cường [66, 108].

**Biến thể Omicron** xuất hiện vào cuối tháng 11/2021, với 3 biến thể BA.1, BA.2 và BA.3, đánh dấu sự khởi đầu của một giai đoạn mới của đại dịch. Ngay sau khi BA.1 chiếm ưu thế, đã được thay thế bởi BA.2 (phân hoá thành các nhóm phụ BA.2.12.1 và BA.2.75) và BA.5. BA.5 đã lưu hành rộng rãi trên toàn cầu [94]. Kể từ khi BA.5 xuất hiện, một số biến thể của Omicron cũng xuất hiện nhưng chiếm tỷ lệ rất nhỏ. Hiện vẫn chưa rõ liệu SARS-CoV- 2 vẫn tiếp tục xuất hiện các biến thể mới hay có xu hướng chuyển sang một quá trình thích ứng dần dần. Năm 2022, nhiều biến thể xuất hiện trong BA.2. và BA.5 theo kiểu từng bước hơn với một số thay đổi về axit amin. Điều này cho thấy sự chuyển đổi sang tiến hoá từng bước dần dần hơn. Biến thể Omicron mặc dù có triệu chứng lâm sàng nhẹ, nguy cơ mắc bệnh nặng và tử vong sau nhiễm trùng thấp hơn so với các các biến thể xuất hiện trước đây, nhưng mức độ lây truyền cao dẫn đến gánh nặng nhập viện tăng, đặt ra nhu cầu lớn cho hệ thống chăm sóc sức khoẻ tại các quốc gia, có thể dẫn tới quá tải, đặc biệt ở nhóm dễ bị tổn thương. Omicron có khả năng tránh được miễn dịch từ vắc xin và nhiễm tự nhiên cao hơn các biến thể trước, làm giảm hiệu quả của vắc xin trong việc ngăn ngừa nhiễm bệnh có triệu chứng, nhưng vắc xin vẫn rất hiệu quả trong việc ngăn ngừa bệnh nặng và tử vong [11].

**Theo dõi và cập nhật biến thể**

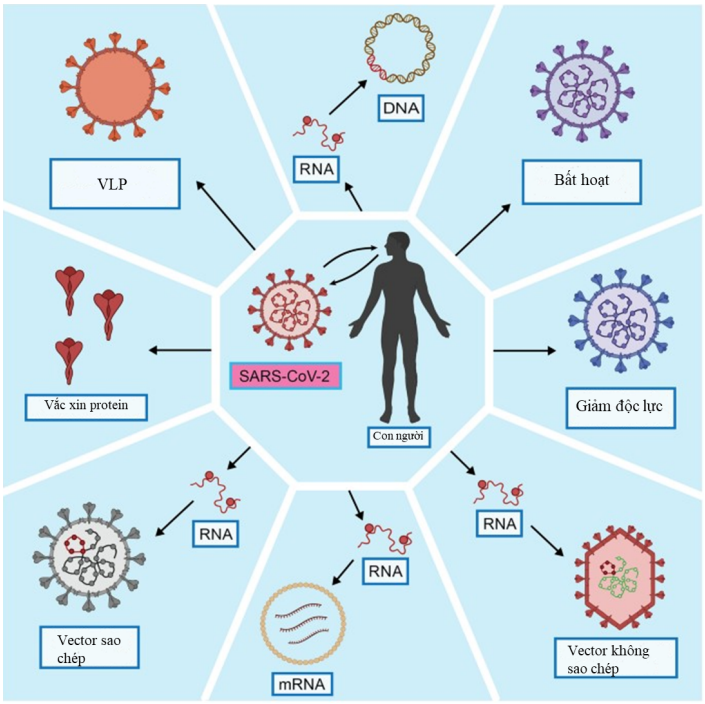
Biến thể SARS-CoV-2 tiếp tục tiến hóa, đòi hỏi hệ thống y tế toàn cầu phải liên tục theo dõi và cập nhật thông tin về các biến thể mới. Các cơ quan y tế quốc tế thường xuyên phân tích dữ liệu gen và sự lây lan để xác định các biến thể mới và đưa ra cảnh báo nếu cần thiết.

Việc phân loại và hệ thống phân loại các biến thể là một phần quan trọng trong chiến lược kiểm soát đại dịch và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

### 1.4. VẮC XIN COVID-19

Quá trình phát triển vắc xin truyền thống có thể kéo dài từ 15 năm trở lên. Giai đoạn nghiên cứu, thiết kế chủng sản xuất vắc xin và thử nghiệm tiền lâm sàng, nghiên cứu độc tính thường kéo dài từ 2-4 năm. Giai đoạn thử nghiệm lâm sàng với 3 giai đoạn I, II và III được thực hiện trong 5-7 năm. Việc phát triển vắc xin SARS-CoV-2 đang theo một dòng thời gian được đẩy nhanh. Do kinh nghiệm có được từ quá trình phát triển ban đầu của vắc xin cho SARS-CoV và MERS-CoV, giai đoạn nghiên cứu tạo chủng được rút ngắn. Thử nghiệm giai đoạn III được bắt đầu sau khi phân tích tạm thời các kết quả giai đoạn I/II, với một số giai đoạn thử nghiệm lâm sàng chạy song song. Trong khi đó, các nhà sản xuất vắc xin đã bắt đầu sản xuất quy mô lớn đối với một số ứng viên vắc xin tiềm năng.

Tính đến 30/3/2023, trên thế giới đã có 183 vắc xin đã được cấp phép hoặc đang thử nghiệm lâm sàng, 199 vắc xin đang trong giai đoạn thử nghiệm tiền lâm sàng (pre-clinical trial).




**Hình 1. 12. Công nghệ sản xuất vắc xin COVID-19 [101]**

**Bảng 1. 5. Công nghệ sản xuất vắc xin đã được cấp phép/đang thử nghiệm lâm sàng (tính đến 30/3/2023) [89]**

| STT | Công nghệ | | Vắc xin | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Số lượng (n) | Tỷ lệ (%) |
| 1 | PS | Protein subunit (Vắc xin tiểu đơn vị protein) | 59 | 32 |
| 2 | VVnr | Viral Vector (non- replicating)<br>Vắc xin vector không có khả năng sao chép | 25 | 14 |
| 3 | DNA | DNA (Vắc xin công nghệ DNA) | 17 | 9 |
| 4 | IV | Inactivated virus (Vắc xin bất hoạt) | 22 | 12 |
| 5 | RNA | RNA (Vắc xin công nghệ RNA) | 43 | 24 |
| 6 | VVr | Viral Vector (replicating)<br>Vắc xin vector có khả năng sao chép | 4 | 2 |
| 7 | VLP | Virus Like Particle<br>Vắc xin phát triển dựa trên hạt giống virus | 7 | 4 |
| 8 | VVr+APC | VVr + Antigen Presenting Cells | 2 | 1 |
| 9 | LAV | Live Attenuated virus<br>Vắc xin SARS-CoV-2 giảm độc lực | 2 | 1 |
| 10 | VVnr+APC | VVnr + Antigen Presenting Cells | 1 | 1 |
| 11 | BacAg-SpV | Bacterial antigen-Spore expression vector | 1 | 1 |
| | | **Tổng** | **183** | **100** |

Công nghệ sản xuất vắc xin tiểu đơn vị protein (Protein Subunit- SP) được phát triển nhiều nhất với 59/183 (32%) vắc xin như Novavax, Sanofi Pasteur + GSK;  đứng thứ 2 là công nghệ sản xuất vắc xin RNA (24%) như Moderna, Pfizer/BioNTech, Arcturus Therapeutics; tiếp theo là vắc xin vector không có khả năng sao chép (14%) - AstraZeneca, Casino Biological; vắc xin bất hoạt (12%) - Sinovac, Sinopharm.; vắc xin công nghệ DNA (9%) và các vắc xin còn lại chiếm tỷ lệ từ 1-4%.

Ngày 14/12/2020, liều vắc xin phòng COVID-19 đầu tiên được tiêm tại Hoa Kỳ [35]. Tính đến ngày 14/8/2021, ít nhất 202 quốc gia và khu vực đã bắt đầu Chương trình tiêm chủng phòng COVID-19 và hơn 4,62 tỷ liều vắc xin đã được tiêm trên toàn thế giới với 16% dân số toàn cầu được tiêm chủng. Trong đó, vắc xin ChAdOx1 nCoV-19 (Astra Zeneca) đã được phân phối ở 184 quốc gia, BNT162b2 (Pfizer) ở 112 quốc gia, mRNA-1273 (Moderna) ở 66 quốc gia, BBIBP-CorV ở 64 quốc gia, Gam-Covid-Vac ở 49 quốc gia, CoronaVac ở 38 quốc gia và Ad26.COV2.S (Janssen) ở 43 quốc gia. Sinopharm-Wuhan và Ad5-nCoV được phê duyệt gần đây chỉ được quản lý ở hai quốc gia, trong khi BBV152 ở 6 quốc gia và EpiVacCorona (Vector Institute) và ZF2001 đã được đưa vào Chương trình tiêm chủng của hai quốc gia. Abdala và Soberna 02 đã được giới thiệu trong Chương trình tiêm chủng của Cuba, trong khi QazVac và Sinopharm/HayatVax lần lượt được sử dụng ở Kazakhstan và UAE [139]

Sự chênh lệch về kinh tế đã ảnh hưởng đáng kể đến việc phân phối vắc xin COVID-19 trên thế giới. Các quốc gia có thu nhập thấp không có cơ hội tiếp cận vắc xin, chỉ có 0,3% tổng số vắc xin được tiêm; 83% tổng số mũi tiêm được áp dụng ở các quốc gia có thu nhập cao và trung bình cao. Số người được tiêm chủng ở Châu Âu, Nam Mỹ, Châu Á và Châu Đại Dương là 91%, 68%, 64% và 41% [139]

Các loại vắc xin đang sử dụng hiện nay được thiết kế dựa trên virus gốc Vũ Hán – Hu D614. Tuy nhiên, dữ liệu nghiên cứu cho thấy các vắc xin ban đầu vẫn có hiệu quả bảo vệ với các biến thể mới như vắc xin BNT162b2 (Pfizer) có hiệu quả với các biến thể mới, mặc dù hiệu quả kém hơn. Vắc xin ChAdOx1 nCoV-19 (Astra Zeneca) có khả năng bảo vệ trước biến thể Alpha, thấp hơn với biến thể Beta. Trong khi đó, vắc xin mRNA-1273 (Moderna) cho thấy hiệu quả cao hơn đối với biến thể Beta [8].

Cùng với sự xuất hiện các biến thể mới và giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh COVID-19 cũng như các biến chứng liên quan, TCYTTG khuyến nghị phát triển vắc xin với các chủng mới được cập nhật [21]. 5 đột biến vùng liên kết thụ thể của tiểu đơn vị S1 đã được phát hiện trong các chủng lưu hành hiện nay là N501Y, K417N/T, L452R, T487K và E484K, trong đó L452K và E484K đã được đưa vào để lựa chọn sản xuất vắc xin. Các nghiên cứu về cấu trúc đã gợi ý việc thay thế các axit amin tại vị trí 452 và 484 sẽ làm tăng sự tương tác với ACE-2 và giúp virus thoát khỏi hệ thống kháng thể trung hoà [45, 107]. Trong khi đó, việc thay thế D614G làm tăng khả năng dịch chuyển vùng liên kết thụ thể RBD sang vị trí "up" cần thiết cho sự tương tác với thụ thể ACE-2, tăng khả năng lây nhiễm và lây truyền SARS-CoV-2. Đột biến này được tìm thấy ở tất cả các biến thể xuất hiện sau này so với virus gốc Vũ Hán - Hu D614G [59, 107]. Đây là các đột đáng quan tâm cần được cập nhật trong vắc xin COVID-19.

Moderna là một trong những công ty điển hình luôn cập nhật và phát triển vắc xin thích ứng với sự thay đổi liên tục của SARS-CoV-2, để duy trì mức độ miễn dịch và hiệu giá kháng thể trung hoà. Sau phiên bản vắc xin đầu tiên mRNA-1273, đến nay Moderna đã phát triển 6 phiên bản vắc xin cập nhật như vắc xin mRNA-1273.211 với 9 đột biến tại protein S của biến thể Beta, vắc xin mRNA-1273.214 với 32 đột biến tại protein S của biến thể Omicron. Các loại

vắc xin cập nhật này sẽ được tiêm như liều tăng cường (booster), được chứng minh có hiệu giá trung hoà vượt trội so với vắc xin mRNA-1273, duy trì kháng thể trong 6 tháng sau khi tiêm với các biến thể Beta và Omicron [80].

**Bảng 1. 6. Một số vắc xin COVID-19 được cấp phép trên thế giới [56]**

| STT | Công ty | Công nghệ sản xuất | Liều dùng | Cấp phép |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Sinovac | CoronaVac, bất hoạt, tá chất Al(OH)3 | 2× (ngày 0 and 14 (0/14) or 0/28) | NCT04352608 |
| 2 | Sinopharm | Bất hoạt toàn hạt virus, tá chất Al(OH)3 | 2.5,5or10μg (i.m.) 3× (0/28/56) 5 μg (i.m.) 2× (0/14 or 0/21) | ChiCTR2000031809 |
| 3 | Cansino | Vắc xin vector (Adeno 5, không có khả năng sao chép, biểu hiện protein S) | 5 × 1010, 1011 VP (i.m.) | NCT04341389 |
| 4 | AstraZeneca | Vắc xin vector (Adeno, không có khả năng sao chép, biểu hiện protein S) | 5 × 1010 VP 1× or 2× (i.m.) | NCT04324606 |
| 5 | Modena | mRNA-1273 | 2× 25, 100, 250 μg (i.m.) | NCT04283461 |
| 6 | Pfizer | BNT162b1 (mRNA – RBD) | 2× 10, 30, 100 μg (i.m.) | NCT04368728 |
| 7 | Pfizer | BNT162b1(mRNA-RBD) BNT162b2(mRNA – protein S) | 2×10,20,30μg | NCT04368728 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 8 | Novavax | NVX CoV2373 (Matrix-M) spike protein ‘rosettes’ | 2× 2.5–25 μg (i.m. ± Matrix-M) 1×25μg(i.m.+ Matrix-M) | NCT04368988 |

Tại Việt Nam, thời gian tiêm phòng vắc xin COVID-19 được triển khai qua nhiều đợt, phụ thuộc vào từng giai đoạn dịch bệnh và số lượng vắc xin nhập về. Quá trình tiêm chủng bắt đầu vào tháng 3 năm 2021, với ưu tiên dành cho các nhóm đối tượng có nguy cơ cao như nhân viên y tế, lực lượng tuyến đầu chống dịch, người cao tuổi và người có bệnh nền.

1. Tháng 3/2021: Bắt đầu tiêm lô vắc xin đầu tiên (AstraZeneca) cho các đối tượng ưu tiên.
2. Tháng 6-8/2021: Việt Nam tăng cường tiêm chủng trong bối cảnh làn sóng dịch bùng phát mạnh, đặc biệt tại TP. Hồ Chí Minh và các tỉnh phía Nam. Nhiều vắc xin khác như Pfizer, Moderna, và Sinopharm cũng được sử dụng.
3. Tháng 9-12/2021: Chiến dịch tiêm chủng diện rộng trên toàn quốc, mở rộng đối tượng tiêm cho toàn bộ người từ 18 tuổi trở lên.

## 1.5. CHẨN ĐOÁN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

### *1.5.1 Phương pháp phát hiện kháng nguyên*

Xét nghiệm nhanh kháng nguyên là xét nghiệm miễn dịch phát hiện định tính kháng nguyên SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Xét nghiệm nhanh kháng nguyên SARS-CoV-2 có ưu điểm thuận tiện khi sử dụng, kết quả nhanh và chi phí thấp so với xét nghiệm Realtime RT-PCR. Ngoài các yếu tố liên quan đến việc lấy mẫu, thời điểm có thể thực hiện xét nghiệm test nhanh kháng nguyên, việc sử dụng loại test nhanh và kết quả của những test nhanh

này cũng là những yếu tố quan trọng trong việc chẩn đoán bệnh COVID-19. Test nhanh được áp dụng rất hiệu quả khi thời điểm dịch xảy ra trên diện rộng, phát hiện kịp thời các ca bệnh dương tính trong cộng đồng để cách ly, điều trị sớm. Tuy nhiên, giá trị xét nghiệm test nhanh SARS-CoV-2 không dùng để thay thế cho xét nghiệm phát hiện vật chất di truyền của SARS-CoV-2 mà chỉ dùng để hỗ trợ trong việc giám sát, phát hiện, chẩn đoán mắc COVID-19.

Trong dịch COVID-19 có rất nhiều sinh phẩm xét nghiệm phát hiện nhanh kháng nguyên SARS-CoV-2 được phát triển và đánh giá. Trong đó, phần lớn là test nhanh nhập khẩu như Standard Q COVID-19 Ag Test, Humasis COVID-19 Ag Test, SARS- CoV-2 Rapid Antigen Test …(Hàn Quốc), test nhanh sản xuất trong nước như Trueline COVID-19 Ag Rapid Test.

### *1.5.2. Phương pháp phát hiện vật liệu di truyền*

#### *1.5.2.1 Phương pháp Realtime RT-PCR*

Xét nghiệm Realtime RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase chain reaction) có khả năng xác định nhanh sự nhiễm virus thông qua xác định vật liệu di truyền RNA của SARS-CoV-2. Realtime RT-PCR được coi là phương pháp có độ chính xác cao để xét nghiệm khẳng định các ca nhiễm SARS-CoV-2. Phương pháp này dựa trên các vùng gen đích như ORF1ab, E, N để xác định sự có mặt của SARS-CoV-2 trong bệnh phẩm dịch đường hô hấp. Thời kì đầu đại dịch, các phòng thí nghiệm chuẩn thức của TCYTTG đã công bố vùng gen đích sử dụng trong chẩn đoán để các nước trên thế giới có thể tham khảo thực hiện: phòng thí nghiệm Charite – Berlin, Đức, Viện các bệnh truyền nhiễm quốc gia Nhật Bản (NIID), Trung tâm kiểm soát bệnh tật Mỹ (US-CDC) (Bảng 1.8) [26, 27, 88, 95, 131].

**Bảng 1. 7. Các gen đích được khuyến cáo chẩn đoán SARS-CoV-2 (tháng 1/2020)**

| STT | Quốc gia | Viện | Gen đích chẩn đoán |
|---|---|---|---|
| 1 | Đức (Berlin) (17/01/2020) | Charite | RdRP, E, N |
| 2 | Hồng Kong (23/01/2020) | Đại học Hồng Kong | ORF1b-nsp14, N |
| 3 | Trung Quốc (24/01/2020) | China CDC | ORF1ab, N |
| 4 | Nhật Bản (24/01/2020) | Viện Quốc gia Các bệnh truyền nhiễm (NIID) | N |
| 5 | Thái Lan (28/01/2020) | Viện Quốc gia sức khoẻ (NIH) | N |
| 6 | Hoa Kỳ (28/01/2020) | Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa bệnh tật, Hoa Kỳ (US CDC) | N1, N2 |

Bộ Y tế đã cấp phép sử dụng nhiều bộ sinh phẩm phát hiện SARS-CoV-2 khác nhau dựa trên kỹ thuật Realtime RT-PCR, sử dụng các đoạn mồi khác nhau trên trình tự gen đích khác nhau để chẩn đoán.

**Bảng 1. 8. Một số sinh phẩm chẩn đoán Realtime RT-PCR đã được Bộ Y tế cấp phép lưu hành [4]**

*(Công văn số 6929/BYT-TB-CT ngày 23/8/2021)*

| TT | Tên sinh phẩm | Hãng/Nước sản xuất | Thông tin sinh phẩm |
|---|---|---|---|
| 1 | Allplex SARS- CoV-2/Flu A/Flu B/RSV Assay (RV10259X, RV10260Y) | Seegene Inc., Hàn Quốc | -Vùng gen phát hiện: S, RdRP, N<br>-Giới hạn phát hiện: Gen S, RdRP, N: 0.14 TCID50/mL<br>-Độ nhạy: 98.79%<br>-Độ đặc hiệu: 98.62%. |
| 2 | cobas® SARS- CoV-2/ 09343733190<br>cobas® SARS- CoV-2/ 09175431190<br>cobas® SARS- CoV-2 Control Kit/ 09175440190 | Roche Molecular Systems, Inc., Mỹ | - Vùng gen phát hiện: Orf1 ab (gồm RdRp)<br>- Độ nhạy phân tích: 25 bản sao/mL cho SARS-CoV-2 (Đích 1) và 32 bản sao/ml cho Sarbecovirus (Đích 2)<br>- Độ đặc hiệu phân tích: 100% |
| 3 | LightMix® Modular SarbecoSARS-CoV-2/ 09164952001 | TIB MOLBIOL Syntheselab or GmbH, Đức | -Vùng gen phát hiện: E<br>- Độ nhạy phân tích: LoD 2.8 - 5 bản sao/phản ứng đối với phản ứng đơn và mẫu chứng tách chiết EAV, 50 bản sao/ phản ứng đối với phản ứng PCR đa mồi<br>-Độ đặc hiệu: 100%.<br>-Độ nhạy lâm sàng: 100%<br>-Độ đặc hiệu lâm sàng: 100% |

*1.5.2.2. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (NGS)*

Đầu những năm 2000, công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới đã được phát triển với nhiều hệ thống khác nhau nhằm mục đích giải trình tự các đoạn DNA có kích thước lớn, như nhiễm sắc thể hay hệ gen sinh vật. Nguyên lý chính của NGS dựa trên việc chia nhỏ vật liệu di truyền thành nhiều đoạn ngắn, sau đó đọc trình tự của từng đoạn này và cuối cùng lắp ráp lại để tái tạo trình tự đầy đủ. Các phương pháp giải trình tự thế hệ mới khác nhau đã được sử dụng thành công gần đây để truy tìm nguồn gốc và tìm hiểu sự tiến hóa của các tác nhân lây nhiễm, điều tra sự lây lan và các chuỗi lây truyền của các đợt bùng phát, COVID-19 cũng như tạo điều kiện phát triển các xét nghiệm chẩn đoán phân tử hiệu quả và nhanh chóng và góp phần vào việc kiếm tìm các phương pháp điều trị và vắc xin. Sự phát triển của các phương pháp giải trình tự hiệu quả và nhanh chóng để tái tạo lại trình tự hệ gen của SARS-CoV-2, tác nhân gây bệnh của COVID-19, là cơ sở cho việc thiết kế các xét nghiệm phân tử chẩn đoán và đề ra các biện pháp và chiến lược hiệu quả để giảm thiểu sự lan truyền của đại dịch.

*Ưu điểm của phương pháp NGS*

- NGS có khả năng giải trình tự hàng triệu đoạn DNA/RNA cùng một lúc, giúp phân tích toàn bộ hệ gen hoặc một số lượng lớn mẫu trong thời gian ngắn.

- NGS có độ chính xác cao trong việc phát hiện các đột biến, bao gồm những thay đổi nhỏ trong trình tự nucleotide.
- NGS có thể phát hiện được nhiều loại biến thể di truyền, từ đột biến điểm đến các biến đổi lớn hơn như chèn, xóa, tái tổ hợp hoặc chuyển đổi vị trí.

*Nhược điểm của phương pháp NGS*

- Mặc dù chi phí trên mỗi mẫu đã giảm đáng kể, việc thiết lập và vận hành các thiết bị NGS vẫn đòi hỏi đầu tư lớn về hạ tầng và nhân lực.
- Dữ liệu từ NGS là rất lớn và phức tạp, cần đến các công cụ sinh tin học mạnh mẽ và chuyên gia để phân tích và giải thích kết quả.
- Quy trình chuẩn bị mẫu phải được thực hiện cẩn thận để đảm bảo độ chính xác, đặc biệt trong việc kiểm soát các yếu tố như nhiễm tạp hoặc phân hủy mẫu.

*Ứng dụng phương pháp NGS trên thế giới trong nghiên cứu SARS-CoV-2*

- Phân tích và theo dõi sự phát triển của các biến thể virus
- Hỗ trợ phát triển vắc xin và thuốc điều trị
- Giám sát dịch tễ học và phát hiện lây nhiễm chéo
- Phát hiện sự tái nhiễm và tái tổ hợp virus

Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) là công cụ không thể thiếu trong nghiên cứu SARS-CoV-2 và theo dõi đại dịch COVID-19 trên toàn thế giới. Với khả năng giải mã nhanh và chính xác bộ gen virus, NGS đã giúp xác định các biến thể mới, hỗ trợ phát triển vắc xin và thuốc điều trị, và cung cấp dữ liệu quý giá để giám sát sự phát triển của đại dịch

Trong đó, giải trình tự gen Illumina là hệ thống xác định trình tự gen thành công và phổ biến nhất cho việc xác định trình tự hệ gen SARS-CoV-2. Illumina đọc trình tự nucleotide thông qua quá trình sinh tổng hợp trên cả 2 sợi DNA được gắn bản (flowcell), không sử dụng mồi đặc hiệu. Tín hiệu phát quang được thu thập dưới dạng chụp ảnh. Các nucleotide sau đó được sắp xếp và ghép đoạn theo phần mềm phân tích dữ liệu của hệ thống Illumina. Phương pháp giải

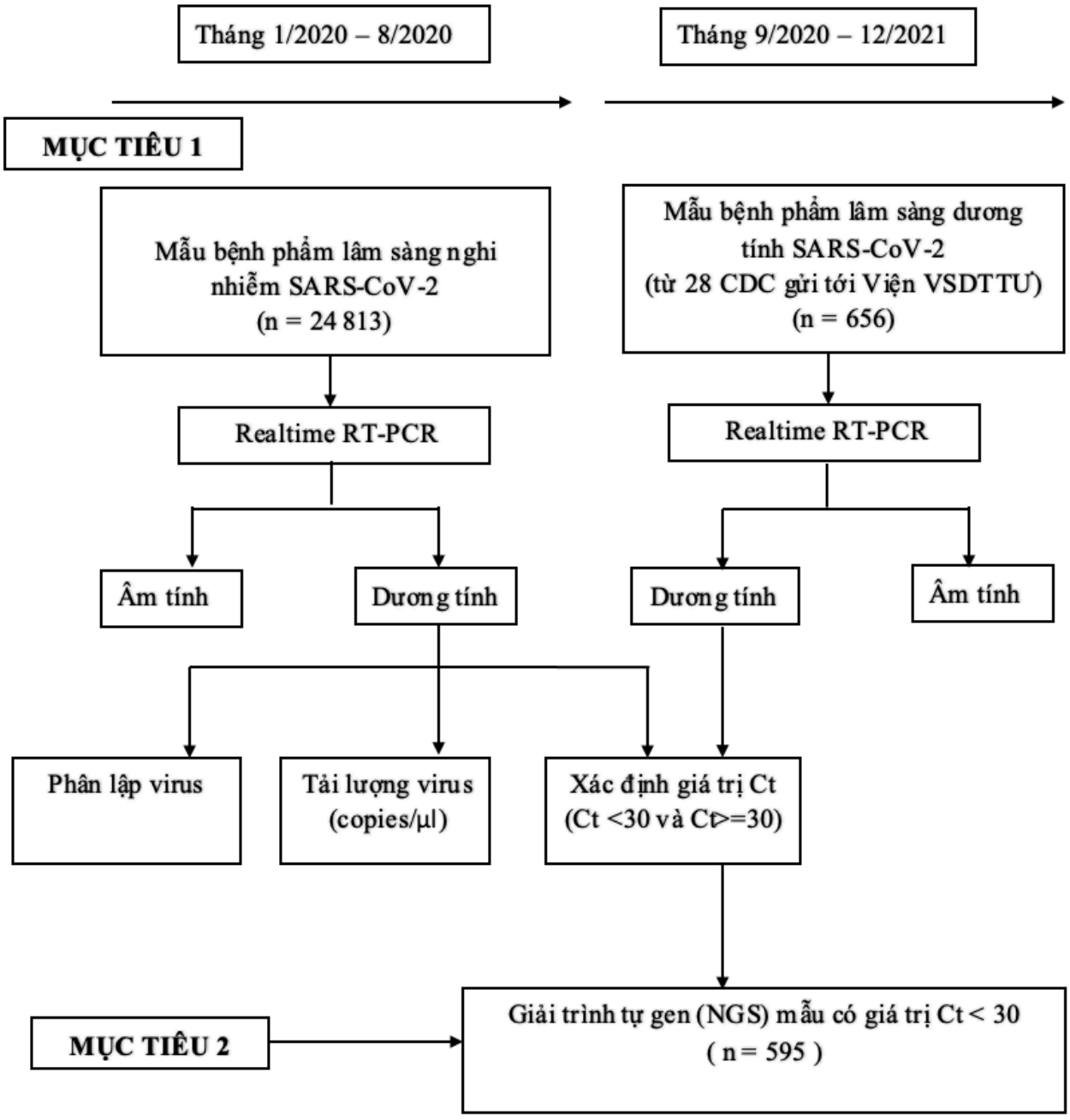
trình tự gen thế hệ mới Illumina thực hiện giải trình tự nucleotide hệ gen SARS-CoV-2 từ bệnh phẩm lâm sàng và từ chủng phân lập với độ chính xác 99% [93].

Tại Việt Nam, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã xây dựng quy trình giải trình tự gen SARS-CoV-2 bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới NGS với mục đích xác định đặc tính di truyền học của SARS-CoV-2 lưu hành tại Việt Nam. Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm đường hô hấp cũng như với các chủng phân lập trên tế bào. Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã áp dụng và tối ưu quy trình để tăng tỷ lệ thu được toàn bộ hệ gen SARS-CoV-2 sau khi giải trình tự [142]

Nghiên cứu đã áp dụng quy trình giải trình tự toàn bộ hệ gen SARS-CoV -2 (Illumina platforms) đã được nhà khoa học Dr. John-Sebastian Eden-Viện Nghiên cứu Y học Westmead - Úc xây dựng tháng 3/2020 [38].

Hiện tại, cổng thông tin GISAID EpiCov đại diện cho kho lưu trữ dữ liệu hệ gen SARS-CoV-2 được sử dụng rộng rãi nhất. GISAID cung cấp hơn 11,3 triệu hệ gen SARS-CoV-2 hoàn chỉnh, được chia sẻ từ hơn 189 quốc gia (dữ liệu được thu thập vào ngày 09/6/2022). Dữ liệu bao gồm loại mẫu, phương pháp giải trình tự được liên kết với từng hệ gen của virus và tình trạng bệnh nhân (ví dụ: nhập viện hoặc xuất viện). So với trình tự virus cúm được chia sẻ từ năm 2008 trên GISAID chỉ có hơn 1,6 triệu trình tự, có thể thấy việc giải trình tự SARS-CoV-2 được tập trung hơn rất nhiều [17].

# CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU




**Hình 2. 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu**

## 2.1. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU NỘI DUNG 1

**Nội dung**: Xác định tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 trong các mẫu thu thập tại miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT-PCR, 2020-2021.

### *2.1.1. Đối tượng nghiên cứu*

Trong giai đoạn đầu của dịch COVID-19 chỉ có 4 đơn vị là Viện Vệ sinh dich tễ Trung ương và 3 Viện Pasteur khu vực có khả năng chẩn đoán khẳng định các ca nhiễm SARS-CoV-2.

- Mẫu bệnh phẩm thu thập từ những ca bệnh nghi nhiễm SARS-CoV-2 theo QĐ 3351/QĐ-BYT (29/7/2020) và QĐ 3468/QĐ-BYT (07/8/2020) của Bộ Y tế [2, 3].

**+ Mẫu bệnh phẩm từ ca bệnh nghi ngờ**

Bao gồm các trường hợp:

*A. Người bệnh có sốt và/hoặc viêm đường hô hấp cấp tính* không lý giải được bằng các nguyên nhân khác.

*B. Người bệnh có bất kỳ triệu chứng hô hấp nào* **VÀ** có tiền sử đến/qua/ở/về từ *vùng dịch tễ* có bệnh COVID-19 trong khoảng 14 ngày trước khi khởi phát các triệu chứng ***HOẶC*** *tiếp xúc gần* với trường hợp bệnh nghi ngờ hoặc xác định COVID-19 trong khoảng 14 ngày trước khi khởi phát các triệu chứng.

**+ Mẫu bệnh phẩm từ ca bệnh xác định**

Là trường hợp bệnh nghi ngờ hoặc bất cứ người nào có xét nghiệm dương tính với vi rút SARS-CoV-2 được thực hiện bởi các cơ sở xét nghiệm do Bộ Y tế cho phép khẳng định.

- Các mẫu bệnh phẩm dương tính với SARS-CoV-2 được thực hiện bởi các Phòng xét nghiệm khẳng định do Bộ Y tế/Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VSDTTƯ) cấp phép.

### *2.1.2. Thiết kế nghiên cứu*

Mô tả cắt ngang kết hợp phân tích phòng thí nghiệm

### *2.1.3. Cỡ mẫu, thời gian và địa điểm*

- Giai đoạn từ tháng 1/2020-8/2020: toàn bộ các mẫu bệnh phẩm (dịch tỵ hầu, dịch họng, dịch nội khí quản) thu thập từ những ca bệnh nghi nhiễm SARS-CoV-2 tại 25 tỉnh/thành miền Bắc và 03 tỉnh miền Trung Việt Nam (Thanh Hoá, Nghệ An và Hà Tĩnh).

- Giai đoạn từ tháng 9/2020-12/2021 các mẫu bệnh phẩm dương tính với SARS-CoV-2 từ 25 tỉnh/thành miền Bắc và và 04 tỉnh miền Trung Việt Nam gửi tới Viện VSDTTƯ.

- Xét nghiệm thực hiện tại Khoa Virus – Viện VSDTTƯ.

**Bảng 2. 1. Số lượng mẫu từ 28 tỉnh/thành phố miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 1/2020- 8/2020**

| STT | Tỉnh/thành phố | Số mẫu (n) | STT | Tỉnh/thành phố | Số mẫu (n) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Bắc Kạn | 79 | 17 | Ninh Bình | 147 |
| 2 | Bắc Giang | 277 | 18 | Vĩnh Phúc | 605 |
| 3 | Bắc Ninh | 332 | 19 | Phú Thọ | 176 |
| 4 | Cao Bằng | 150 | 20 | Quảng Ninh | 144 |
| 5 | Điện Biên | 273 | 21 | Sơn La | 227 |
| 6 | Hà Giang | 1031 | 22 | Thái Bình | 859 |

| | | |
|---|---|---|
| 7 | Hà Nam | 774 |
| 8 | Hà Nội | 11501 |
| 9 | Hải Dương | 383 |
| 10 | Hải Phòng | 288 |
| 11 | Hoà Bình | 196 |
| 12 | Hưng Yên | 461 |
| 13 | Lạng Sơn | 339 |
| 14 | Lai Châu | 813 |
| 15 | Lào Cai | 224 |
| 16 | Nam Định | 263 |

| | | |
|---|---|---|
| 23 | Thái Nguyên | 137 |
| 24 | Tuyên Quang | 138 |
| 25 | Yên Bái | 128 |
| 26 | BV Bạch Mai | 1800 |
| 27 | BV Bệnh NĐTƯ | 252 |
| 28 | Hà Tĩnh | 265 |
| 29 | Nghệ An | 411 |
| 30 | Thanh Hóa | 427 |
| 31 | Khác | 1713 |
| | **Tổng số** | **24813** |

- Áp dụng công thức tính cỡ mẫu sau:

$$n = \frac{Z^2_{\left(1-\frac{\alpha}{2}\right)x} \cdot p(1-p)}{d^2}$$

Trong đó:

- Z: Hệ số tin cậy, với α = 0,01 ta có Z (1-α/2) = 2,58
- d: Độ chính xác tuyệt đối, lấy d = Ɛp =0.1*0,037 = 0,0037
- p: Tỷ lệ nhiễm virus SARS-CoV-2 trong cộng đồng. Tham khảo nghiên cứu của Lei Lou và cộng sự, p = 0.037 [70]

Theo công thức trên, cỡ mẫu tối thiểu là: 17.300 người.

Thực tế có 24.813 mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus SARS-CoV-2 đã được thu thập. Như vậy, số lượng mẫu thu thập đáp ứng được cỡ mẫu tối thiểu cho phân tích thống kê trong nghiên cứu này.

### *2.1.4. Biến số nghiên cứu*

Biến số nghiên cứu được xác định tương ứng với cách thu thập dữ liệu. Nhóm biến số dựa trên phiếu yêu cầu xét nghiệm gồm tuổi, giới tính, nguồn gốc mẫu, tỉnh/thành phố. Các biến số dựa trên kết quả xét nghiệm gồm giá trị Ct, tải lượng virus, phân lập virus.

**Bảng 2. 2. Biến số và chỉ số nghiên cứu**

| STT | Biến số | Chỉ số |
|---|---|---|
| 1 | Tuổi | Tuổi trung bình |
| 2 | Giới tính | Định tính giới<br>Số lượng nam và nữ |
| 3 | Nguồn gốc mẫu | Nhập cảnh<br>Cộng đồng |
| 4 | Giá trị Ct (Cycle threshold) | Giá trị Ct <30<br>Giá trị Ct >=30 |
| 5 | Tải lượng virus | Copies/µl<br>Trung bình |

### *2.1.5. Phương pháp xét nghiệm*

#### 2.1.5.1. Phương pháp Realtime RT-PCR xác định SARS-CoV-2

Nguyên lý: sử dụng phản ứng Realtime RT-PCR tạo ra các sản phẩm khuếch đại từ hệ gen của SARS-CoV-2 có trong mẫu bệnh phẩm. RNA tổng số được tách chiết từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm SARS-CoV-2. Sau đó, RNA được cho vào hỗn hợp sinh phẩm realtime RT-PCR với mồi, probe đặc hiệu để khuếch đại đoạn gen đích trên gen E (Envelop), gen RdRp (Polymerase) và gen N (Nucleocapsid). Phương pháp này sử dụng một mẫu dò phát huỳnh

quang (probe) có khả năng phát hiện sản phẩm PCR đặc hiệu trong quá trình khuếch đại.

Quy trình chuẩn thực hiện: RNA được tách chiết bằng bộ sinh phẩm QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen-52904 - 50 phản ứng hoặc 52906 - 250 phản ứng). Phản ứng Realtime RT-PCR sử dụng mồi và probe của hệ thống Charite - Berlin theo khuyến nghị của TCYTTG [90] sinh phẩm SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen-11732020 - 100 phản ứng hoặc 11732088 - 500 phản ứng).

**Bảng 2. 3. Trình tự mồi và probe Charité – Berlin theo khuyến cáo của TCYTTG (17/1/2020) [90]**

| STT | Tên mồi | | Trình tự (5'-3') |
|---|---|---|---|
| 1 | RdRP gene | RdRP_SARSr-F2 | GTGARATGGTCATGTGTGGCGG |
| | | RdRP_SARSr-R1 | CARATGTTAAASACACTATTAGCATA |
| | | RdRP_SARSr-P2 | FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ |
| 2 | E gene | E_Sarbeco_F1 | ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT |
| | | E_Sarbeco_R2 | ATATTGCAGCAGTACGCACACA |
| | | E_Sarbeco_P1 | FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ |
| 3 | N gene | N_Sarbeco_F1 | CACATTGGCACCCGCAATC |
| | | N_Sarbeco_R2 | GAGGAACGAGAAGAGGCTTG |
| | | N_Sarbeco_P1 | FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ |

FAM, 6-carboxyfluorescein; BBQ, blackberry quencher

Nhận định kết quả: Giá trị Ct (ngưỡng chu kỳ - Cycle threshold) dùng để phát hiện RNA của SARS-CoV-2. Ct là số lượng chu kỳ mà máy Realtime đã chạy để phát hiện ra virus ở mức độ đủ để được nhận biết bởi cảm biến của máy. Nói cách khác, giá trị Ct là số chu kỳ cần thiết để sản phẩm PCR đạt đến một mức độ mà tín hiệu huỳnh quang có thể đo lường được.

Giá trị Ct phản ánh tải lượng (nồng độ) virus ban đầu. Giá trị Ct càng thấp, nghĩa là mất ít chu kỳ hơn để vượt qua ngưỡng, cho thấy tải lượng virus ban đầu trong mẫu càng cao.

+ Tháng 1/2020 - 7/2020: xét nghiệm cả 3 gen E, RdRp và N

+ Tháng 8/2020: xét nghiệm 1 gen E hoặc E và RdRp

- Mẫu dương tính:

+ Gen E có tín hiệu huỳnh quang được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 32 của phản ứng (đường cong tuyến tính) và bệnh nhân phải có triệu chứng lâm sàng, có yếu tố dịch tễ liên quan đến COVID-19.

+ Trường hợp triệu chứng lâm sàng, có yếu tố dịch tễ liên quan đến COVID-19 không có hoặc ít liên quan, cần phải có tín hiệu huỳnh quang gen E và RdRp thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 35 của phản ứng.

- Mẫu âm tính: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận tại hoặc sau chu kỳ thứ 38 của phản ứng.

- Mẫu nghi ngờ: Gen E có tín hiệu huỳnh quang được thu nhận sau chu kỳ 32 đến chu kỳ 38 của phản ứng. Mẫu bệnh phẩm sẽ được thực hiện tiếp theo với gen RdRp và/hoặc gen N.

Quy trình xét nghiệm Realtime RT-PCR xác định SARS-CoV-2 trong Phụ lục 1

**2.1.5.2. Tải lượng RNA SARS-CoV-2**

Tải lượng virus là lượng virus có trong mẫu, được đo bằng số lượng bản sao RNA trong một đơn vị thể tích của mẫu và thường được biểu diễn dưới dạng log, có mối tương quan nghịch giữa tải lượng virus và giá trị Ct. Tải lượng virus cao trong mẫu sẽ dẫn đến việc tín hiệu PCR đạt ngưỡng nhận biết sớm, dẫn đến giá trị Ct thấp và ngược lại.

Kỹ thuật đo tải lượng virus được thực hiện trên hệ thống máy ABI 7500 Fast. Nguyên lý cơ bản của phương pháp sử dụng phản ứng Realtime RT-PCR tạo ra các sản phẩm khuếch đại từ hệ gen của SARS-CoV-2 có trong mẫu bệnh phẩm. Lượng sản phẩm gen đích tạo ra sau mỗi chu kỳ khuếch đại được xác định bởi đoạn oligonucleotide đánh dấu huỳnh quang. Chu kì khuếch đại mà tại đó tín hiệu huỳnh quang được phát hiện tỷ lệ nghịch với nồng độ RNA SARS-CoV-2 có trong mẫu ban đầu. Nồng độ RNA trong các mẫu lâm sàng được định lượng trên gen E, mỗi mẫu được thực hiện 2 lần. Mẫu chuẩn được pha loãng theo tỷ lệ 1:10, từ $10^{-2}$ đến $10^{-7}$, đường chuẩn (standard curve) được xây dựng bằng phần mềm ABI7500 software V2.3 với 8 nồng độ pha loãng (8 điểm), nồng độ được xác định bằng copies/µl. Phương pháp được hiệu chuẩn theo mẫu tham chiếu được chia sẻ bởi Viện Quốc gia Các bệnh truyền nhiễm (NIID), Nhật Bản.

**2.1.5.3. Phân lập SARS-CoV-2**

Các mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với SARS-CoV-2 được phân lập trên 3 dòng tế bào Vero khác nhau để xác định tính cảm nhiễm của SARS-CoV-2: (1) Vero E6 – Nikken: được chia sẻ từ PTN Hữu nghị Nagasaki tại Viện VSDTTƯ; (2) Vero – Polyvac: được chia sẻ từ Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất vắc xin và Sinh phẩm y tế và (3) Vero-E6: lưu tại PTN Cúm – Viện VSDTTƯ được sử trong nghiên cứu SARS-2003.

Tế bào Vero/Vero E6 được duy trì trong môi trường MEM 2%; 500 µL mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính được cấy vào tế bào ở 37°C/5% CO2. Sự

nhân lên của virus được theo dõi bằng cách quan sát sự huỷ hoại tế bào (CPE) hàng ngày. Các mẫu có hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE) được thu hoạch và kiểm tra tải lượng virus bằng xét nghiệm Realtime RT-PCR.

Phân lập SARS-CoV-2 được thực hiện trong phòng thí nghiệm An toàn sinh học cấp 3 (BSL3) tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Quy trình Phân lập SARS-CoV-2 trong Phụ lục 2

#### 2.1.5.4. Hoá chất, sinh phẩm và trang thiết bị

Các hoá chất, sinh phẩm và trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu đã được tối ưu hoá cho quy trình xét nghiệm Realtime RT-PCR, tải lượng virus, phân lập virus. Chi tiết theo quy trình xét nghiệm trong phụ lục 1, 2.

### *2.1.6. Quản lý và phân tích dữ liệu*

- Dữ liệu phòng thí nghiệm được nhập vào cơ sở dữ liệu FileMaker Pro 19 Advanced.

- Phân tích bằng Prism software, Excel.

- Kết quả chẩn đoán được phản hồi cho các đơn vị gửi mẫu và báo cáo lên Bộ Y tế  trong 24–48 giờ sau khi nhận mẫu.

### *2.1.7. Hạn chế sai số*

- Số liệu được làm sạch, loại bỏ sai số nhiễu trước khi phân tích.

- Hệ thống máy xét nghiệm phục vụ nghiên cứu được bảo dưỡng, hiệu chuẩn định kỳ.

- Các xét nghiệm được thực hiện có sự giám sát chặt chẽ và kiểm soát chéo, tuân thủ các bước theo quy trình xét nghiệm được quản lý theo hệ thống quản lý chất lượng ISO 15189:2012.

### *2.1.8. Đạo đức trong nghiên cứu*

Nghiên cứu đã được chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học số 03/CN-HĐĐĐ ngày 21/02/2020 tại Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh và nghiên cứu Y sinh học số HĐĐĐ-16/2020 ngày 25/09/2020 tại Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Một số mẫu trong giai đoạn đầu được sử dụng trong nghiên cứu trước khi phê duyệt y đức là những mẫu được chuyển về Viện VSDTTƯ để xét nghiệm theo nhiệm vụ phòng, chống dịch của Bộ Y tế giao.

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỤC TIÊU 2

**Nội dung:** Phân tích đặc điểm phân tử của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS), 2020-2021.

### *2.2.1. Đối tượng nghiên cứu*

Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu giải trình tự gen từ các mẫu được khẳng định dương tính với SARS-CoV-2:

+ Mẫu lâm sàng: lựa chọn các mẫu bệnh phẩm có giá trị Ct <30 [103].

+ Mẫu phân lập: mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính được phân lập trên tế bào Vero - E6, các mẫu có hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE) được thu hoạch và kiểm tra nồng độ bằng xét nghiệm Realtime RT-PCR.

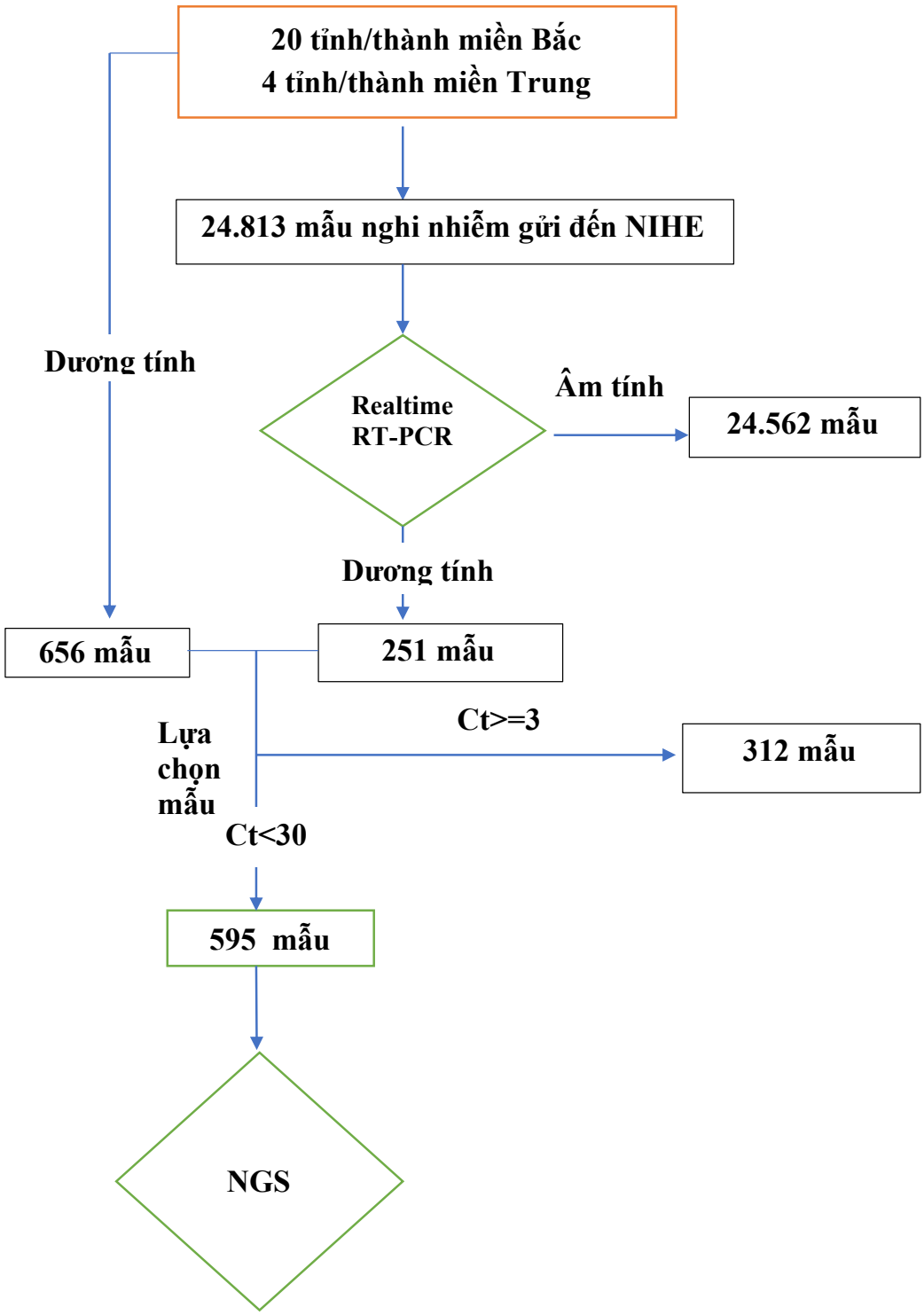
Các mẫu có giá trị Ct < 30 thường có tải lượng RNA đủ để thu được trình tự đầy đủ của bộ gen SARS-CoV-2, bao gồm cả các vùng mã hóa quan trọng trên protein gai, liên quan đến khả năng lây nhiễm của virus. Đồng thời, đảm bảo rằng sinh phẩm được sử dụng hiệu quả, tránh lãng phí khi không thu được toàn bộ hệ gen virus với các mẫu có giá trị Ct>=30

***2.2.2. Thiết kế nghiên cứu:*** *Phân tích phòng thí nghiệm.*

***2.2.3. Cỡ mẫu, thời gian và địa điểm***

Cỡ mẫu: Từ tháng 1/2020 đến tháng 12/2021, toàn bộ 595 mẫu có giá trị Ct < 30 đủ tiêu chuẩn được lựa chọn để thực hiện giải trình tự gen, xác định các biến thể SARS-CoV-2 lưu hành (595 mẫu). Các mẫu được đại diện cho 20 tỉnh/thành phố ở miền Bắc và 4 tỉnh miền Trung.

Xét nghiệm thực hiện tại Khoa Virus – Viện VSDTTƯ




**Hình 2. 2. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu mục tiêu 2**

### *2.2.4. Biến số nghiên cứu*

**Bảng 2. 4. Biến số và chỉ số nghiên cứu**

| STT | Biến số | Chỉ số |
|---|---|---|
| 1 | Tuổi | Tuổi trung bình |
| 2 | Giới tính | Định tính giới<br>Số lượng nam và nữ |
| 3 | Nguồn gốc mẫu | Nhập cảnh<br>Cộng đồng |
| 4 | Mô tả trình tự gen SARS-CoV-2 | % tương đồng nucleotide<br>% tương đồng axit amin<br>Giá trị p, giá trị q (Fisher exact test) |
| 5 | Cây phát sinh chủng loại | Mô hình GTR+G và boottrap 1000 |

### *2.2.5. Phương pháp xét nghiệm*

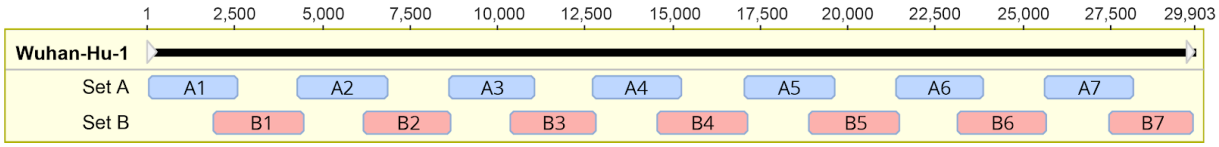
Hệ thống mồi sử dụng trong kỹ thuật giải trình tự gen cho SARS-CoV-2 được trình bày chi tiết trong bảng 2.5.

Quy trình thực hiện: Các mẫu lâm sàng được giải trình tự gen bằng cách sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trên nền tảng Iseq 100. Để chuẩn bị thư viện, RNA được tách chiết sử dụng bộ kit QIAamp RNA. Sợi đơn DNA bổ sung (cDNA) được tổng hợp bằng hệ thống tổng hợp chuỗi SuperScript III (Invitrogen) với các hexamer ngẫu nhiên. DNA sợi đôi được tổng hợp bằng cách sử dụng 14 cặp mồi tổng hợp thành 14 đoạn DNA với kích thước mỗi đoạn khoảng 2,5kb [38]. Sản phẩm 14 đoạn PCR được trộn trong cùng một thể tích và được tinh chế bằng ExoSAP-IT Express (Thermo Fisher, USA). Các sản phẩm PCR tinh khiết đã được chuẩn bị cho thư viện giải trình tự bằng bộ chuẩn bị Thư viện DNA Nextera XT (Illumina, Hoa Kỳ). Sau đó, thư viện được

giải trình tự trên hệ thống thiết bị Illumina Iseq 100 với chu trình iSeq 100 Reagent micro v2 300 (bao gồm Cartridge và Flowcell).

Quy trình Giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) SARS-CoV-2 trong Phụ lục 3

**Bảng 2. 5. Hệ thống mồi sử dụng khuếch đại hệ gen SARS-CoV-2 [38]**




| PCR | Hệ thống mồi | Trình tự (5'-3') | Kích thước |
|---|---|---|---|
| A1 | SARS2_A1F_31 | ACCAACCAACTTTCGATCTCTTGT | 2562 |
| | SARS2_A1R_2569 | GCTTCAACAGCTTCACTAGTAGGT | |
| A2 | SARS2_A2F_4295 | ACAGTGCTTAAAAAGTGTAAAAGTGCC | 2579 |
| | SARS2_A2R_6847 | ACAGTATTCTTTGCTATAGTAGTCGGC | |
| A3 | SARS2_A3F_8596 | ACTTGTGTTCCTTTTTGTTGCTGC | 2479 |
| | SARS2_A3R_11049 | GAACAAAGACCATTGAGTACTCTGGA | |
| A4 | SARS2_A4F_12711 | TACGACAGATGTCTTGTGCTGC | 2536 |
| | SARS2_A4R_15225 | TAACATGTTGTGCCAACCACCA | |
| A5 | SARS2_A5F_16847 | ACTATGGTGATGCTGTTGTTTACCG | 2432 |
| | SARS2_A5R_19254 | ACCAGGCAAGTTAAGGTTAGATAGC | |
| A6 | SARS2_A6F_21358 | ACAAATCCAATTCAGTTGTCTTCCTATTC | 2490 |
| | SARS2_A6R_23823 | TGTGTACAAAAACTGCCATATTGCA | |
| A7 | SARS2_A7F_25602 | ACTAGCACTCTCCAAGGGTGTT | 2571 |
| | SARS2_A7R_28146 | AGGTTCCTGGCAATTAATTGTAAAAGG | |
| B1 | SARS2_B1F_1876 | ATCAGAGGCTGCTCGTGTTGTA | 2575 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | SARS2_B1R_4429 | AGTTTCCACACAGACAGGCATT | |
| B2 | SARS2_B2F_6287 | TGGTGTATACGTTGTCTTTGGAGC | 2565 |
| | SARS2_B2R_8828 | CACTTCTCTTGTTATGACTGCAGC | |
| B3 | SARS2_B3F_10363 | TGTTCGCATTCAACCAGGACAG | 2440 |
| | SARS2_B3R_12780 | CCTACCTCCCTTTGTTGTGTTGT | |
| B4 | SARS2_B4F_14546 | AGGAATTACTTGTGTATGCTGCTGA | 2607 |
| | SARS2_B4R_17131 | ACACTATGCGAGCAGAAGGGTA | |
| B5 | SARS2_B5F_18897 | TGTTAAGCGTGTTGACTGGACT | 2559 |
| | SARS2_B5R_21428 | TGACCTTCTTTTAAAGACATAACAGCAG | |
| B6 | SARS2_B6F_23123 | CCAGCAACTGTTTGTGGACCTA | 2551 |
| | SARS2_B6R_25647 | AGGTGTGAGTAAACTGTTACAAACAAC | |
| B7 | SARS2_B7F_27447 | TCACTACCAAGAGTGTGTTAGAGGT | 2420 |
| | SARS2_B7R_29837 | TTCTCCTAAGAAGCTATTAAAATCACATGG | |

### *2.2.6. Quản lý và phân tích dữ liệu*

*Quản lý dữ liệu giải trình tự

- Toàn bộ dữ liệu giải trình tự được lưu trữ trên BaseSpace – Illumina Sequencing Hub (Illumina) và trong hệ thống máy giải trình tự. Kết quả mỗi lần giải trình tự được phân tích tự động trên BaseSpace và phần mền Local Run Manager.
- File kết quả FastQ của từng mẫu được lưu trữ cả trên BaseSpace, máy giải trình tự và ổ cứng lưu trữ dữ liệu giải trình tự của Phòng thí nghiệm.

Trong trường hợp mất kết nối Internet, dữ liệu không được tải lên BaseSpace thì vẫn có dữ liệu trong máy giải trình tự và phòng thí nghiệm.

*Lắp ráp hệ gen và tìm đột biến

- File kết quả FastQ của từng mẫu được phân tích bằng phần mềm CLC Genomics Workbench 11.0 (Qiagen, Đức). Đây là một phần mềm thương mại có bản quyền dành riêng cho việc phân tích các kết quả giải trình tự gen thế hệ mới.

Các mẫu trước khi phân tích sẽ được kiểm tra chất lượng giải trình tự, chất lượng các đoạn đọc, cắt adapter và các nucleotide nhiễu ở hai đầu trình tự, loại bỏ các đoạn chất lượng thấp hoặc quá ngắn.

Các đoạn đọc này sẽ được sắp xếp dựa theo trình tự SARS-CoV-2 tham khảo là hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124 trên GISAID).

Sau khi có trình tự của virus, xác định các điểm đột biến nucleotide và axit amin bằng phần mềm CLC Genomics Workbench 11.0 và AliView phiên bản 1.27 [136]

*Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại là một kỹ thuật dùng để xác định mối quan hệ tiến hóa giữa các loài, nhóm sinh vật, hoặc các gen thông qua việc phân tích dữ liệu di truyền (DNA, RNA, hoặc protein). Cây phát sinh chủng loại cho phép các nhà khoa học theo dõi quá trình tiến hóa và sự phân nhánh của các loài từ tổ tiên chung. Cụ thể trong nghiên cứu các virus như SARS-CoV-2, cây phát sinh chủng loại giúp xác định sự phát triển của các biến thể mới, sự lây lan và quá trình đột biến của chúng.

Trình tự của SARS-CoV-2 trên thế giới được lựa chọn làm trình tự tham khảo trên cây gia hệ.

Trình tự thu thập được căn chỉnh để tìm ra các điểm tương đồng và khác biệt. Việc căn chỉnh giúp so sánh các đoạn trình tự tương đồng về mặt di truyền nhằm phát hiện các đột biến hoặc thay đổi. Các trình tự này cùng với các trình tự virus trong nghiên cứu được sắp xếp thẳng hàng với nhau bằng phần mềm MEGA X.

Cây phát sinh chủng loại hệ gen của SARS-CoV-2 được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum likelihood, mô hình GTR+G giúp tính toán xác suất thay đổi giữa các nucleotide và bootstrap 1000.

Phương pháp Maximum likelihood tìm kiếm cây phát sinh có khả năng cao nhất dựa trên dữ liệu trình tự và mô hình tiến hóa đã chọn. Maximum likelihood tính toán xác suất xảy ra của các thay đổi di truyền trên từng nhánh của cây và chọn cây có tổng xác suất cao nhất. Đây là phương pháp chính xác nhưng yêu cầu nhiều tính toán và thường mất nhiều thời gian

### *2.2.7. Hạn chế sai số*

Dữ liệu giải trình tự cần đạt các tiêu chuẩn kỹ thuật theo bảng 2.6

**Bảng 2. 6. Tiêu chuẩn kỹ thuật trong kỹ thuật giải trình tự gen**

| Thông số | Mô tả | Tỉ lệ cần đạt |
|---|---|---|
| % Q30 Read 1 | Tỷ lệ % đọc base của Read 1 với điểm Q30 | >70% |
| % Q30 Read 2 | Tỷ lệ % đọc base của Read 2 với điểm Q30 | >70% |
| % Cluster PF | Tỷ lệ % cluster đạt chất lượng | 65-95% |
| % Occupancy | Tỷ lệ % của giếng trên flow cell có chứa cluster | 50-95% |
| Projected Total Yield | Số lượng base dự kiến được xác định cho lần chạy | Thông số tuỳ theo bộ kit sử dụng |

Dữ liệu trình tự gen được phân tích bằng các bước đảm bảo chất lượng sau xét nghiệm, bao gồm phần mềm đánh giá chất lượng trình tự CLC Genomics Workbench 11.0, phần mềm MEGA phân tích khoảng cách di truyền và phân loài.

# CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

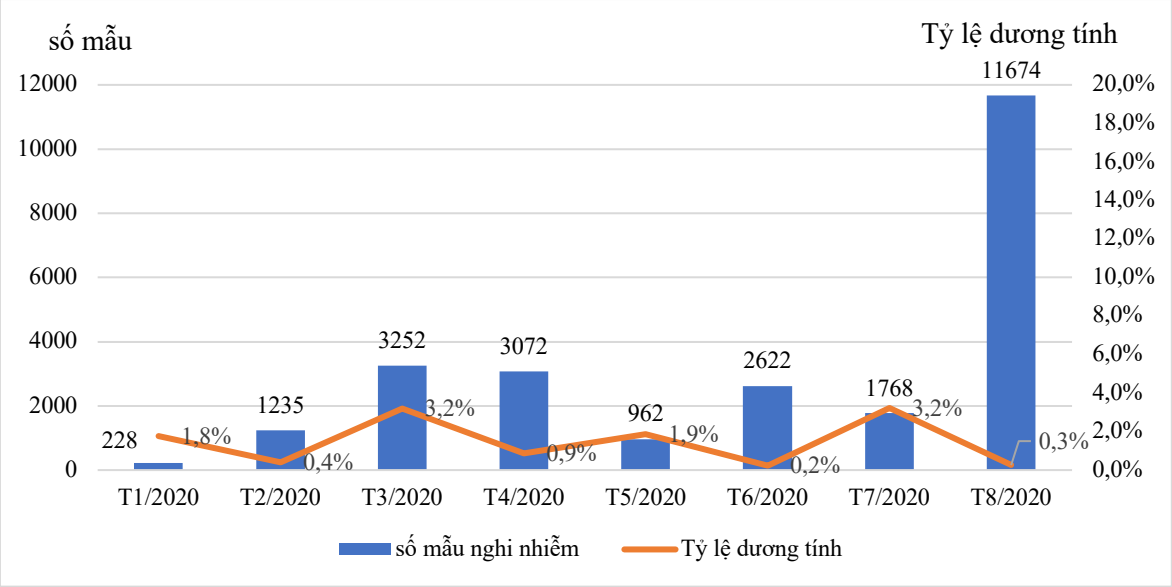
## 3.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ DƯƠNG TÍNH SARS-COV-2 TRONG CÁC MẪU THU THẬP TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP REALTIME RT-PCR, 2020-2021

Trong giai đoạn đầu đại dịch từ tháng 01/2020 đến tháng 08/2020, Viện VSDTTƯ vừa trực tiếp xét nghiệm mẫu bệnh nhân COVID- 19 nghi nhiễm cho 25 tỉnh/thành phía Bắc và 03 tỉnh miền Trung cũng như các bệnh viện tuyến Trung ương, đồng thời tập huấn chuyển giao kỹ thuật xét nghiệm SARS-CoV-2 cho các Trung tâm Kiểm soát bệnh tật (CDC) và các bệnh viện để các địa phương chủ động trong việc phòng chống dịch. Đến tháng 09/2020, khi các Trung tâm Kiểm soát bệnh tật và các bệnh viện đã đủ năng lực xét nghiệm các ca bệnh COVID-19 và đã được đánh giá phòng xét nghiệm, Viện VSDTTƯ chỉ tiếp nhận các ca nhiễm để khẳng định kết quả dương tính từ các tỉnh/thành phố và thực hiện các nghiên cứu về virus học.

Để đánh giá tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 trong các mẫu thu thập tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, nghiên cứu đã thực hiện trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm SARS-CoV-2 trong thời gian từ tháng 1/2020 - tháng 8/2020. Trong giai đoạn tiếp theo từ tháng 9/2020 - tháng 12/2021, các mẫu dương tính được khẳng định và lựa chọn để nghiên cứu đặc điểm phân tử SARS-CoV-2.

### *3.1.1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 theo tháng và địa điểm thu thập, 1/2020-8/2020*

Tổng số mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm SARS-CoV-2 từ 28 Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh (CDC) và bệnh viện gửi tới Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VSDTTƯ) xét nghiệm trong 8 tháng là 24.813 ca nghi nhiễm.

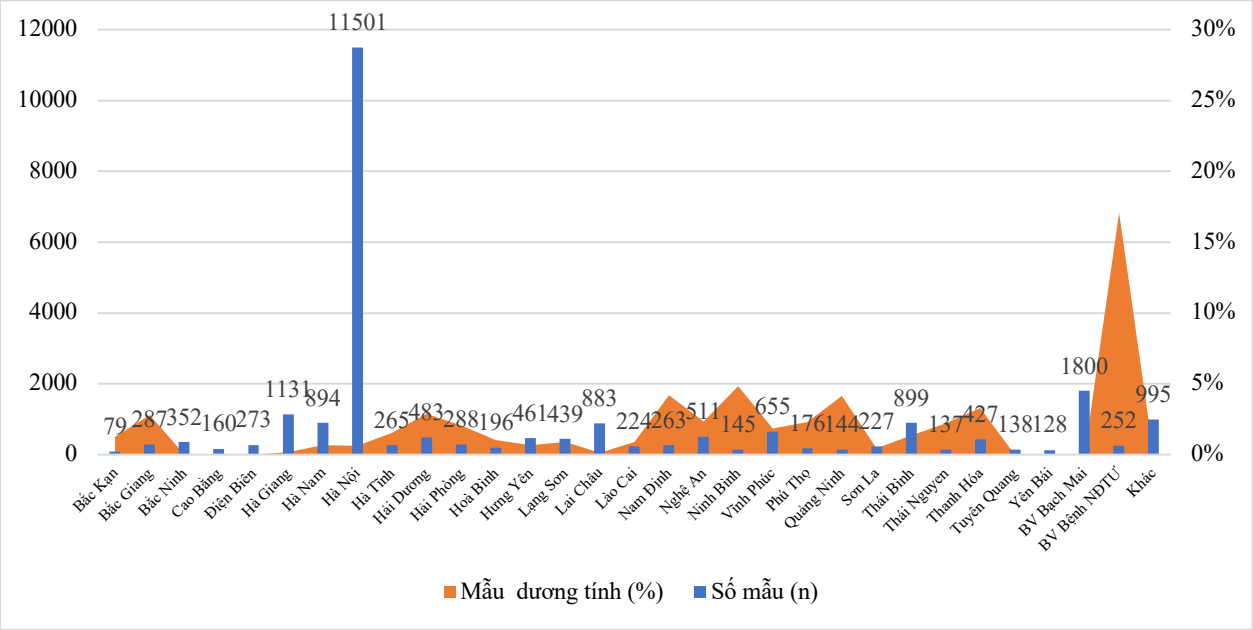



**Hình 3. 1. Mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 thu thập theo tháng tại miền Bắc Việt Nam, 1/2020 - 8/2020**

Tháng 3/2020 và tháng 8/2020 là hai tháng thu thập được số mẫu cao nhất với số mẫu >3000 mẫu và gần 12.000 mẫu. Thời điểm tháng 3/2020 là thời kỳ cao trào của làn sóng dịch thứ nhất với 16 ca bệnh được xác định dương tính, trong đó 12 trường hợp dương tính đi lao động ở Vũ Hán và trở về Sơn Lôi, Vĩnh Phúc. Số mẫu nghi nhiễm tháng 8/2020 là bắt đầu vào làn sóng dịch thứ 2, đó cũng là thời điểm xảy ra dịch COVID-19 tại Đà Nẵng, cả thành phố thực hiện giãn cách xã hội. Kết quả xét nghiệm Realtime RT-PCR xác định 251 (1,0%) mẫu dương tính với SARS-CoV-2. Tỷ lệ mẫu dương tính tháng 3/2020 và tháng 7/2020 ghi nhận nhiều nhất, đều là 3,2% (Hình 3.1)

Số lượng mẫu thu thập cao nhất tại Hà Nội với 11.501 mẫu, Bệnh viện Bạch Mai là 1800 mẫu. Trong 28 CDC gửi mẫu, 5 tỉnh có số lượng mẫu nghi nhiễm > 500 mẫu là Hà Giang (1031 mẫu), Thái Bình (859 mẫu), Lai Châu (813 mẫu), Hà Nam (774 mẫu) và Vĩnh Phúc (605 mẫu). Các tỉnh còn lại có số lượng mẫu nghi nhiễm < 500 mẫu, trong đó Bắc Kạn là tỉnh có số mẫu nghi

nhiễm thấp nhất (79 mẫu). Ngoài ra, trong nghiên cứu có 995 mẫu (3,2%) thiếu thông tin về địa điểm gửi mẫu (Hình 3.2).




**Hình 3. 2. Mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 thu thập tại 28 tỉnh/thành và bệnh viện, 1/2020 - 8/2020**

Trong 28 tỉnh, 5 tỉnh xác định không có trường hợp nào nhiễm SARS-CoV-2 như Bắc Ninh, Cao Bằng, Điện Biên, Tuyên Quang, Yên Bái. Tỷ lệ dương tính với SARS-CoV-2 tại 23 tỉnh còn lại từ 0.1% (Lai Châu) đến 4,8% (Ninh Bình). Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương là đơn vị được Bộ Y tế chỉ định thu dung và điều trị bệnh nhân COVID-19 nặng, vì vậy tỷ lệ mẫu bệnh phẩm thu thập tại bệnh viện dương tính với SARS-CoV-2 cao, 43/251 tổng số mẫu dương tính, chiếm tỷ lệ 17,1%.

### *3.1.2. Kết quả tải lượng RNA SARS-CoV-2 và mối tương quan giữa tải lượng virus với giá trị Ct, 1/2020-8/2020*

Giá trị Ct (ngưỡng chu kỳ - Cycle threshold) dùng để phát hiện RNA của SARS-CoV-2. Giá trị Ct là số chu kỳ cần thiết để sản phẩm PCR đạt đến một

mức độ mà tín hiệu huỳnh quang có thể đo lường được. Giá trị Ct phản ánh tải lượng (nồng độ) virus ban đầu. Giá trị Ct càng thấp, nghĩa là số lượng chu kỳ để vượt qua ngưỡng thấp, cho thấy tải lượng virus ban đầu trong mẫu càng cao.

**Bảng 3. 1. So sánh các mẫu dương tính theo giá trị Ct ở nhóm người nhập cảnh và nhóm cộng đồng**

| Nhóm | Số mẫu dương tính | | Tổng số |
|---|---|---|---|
| | Ct value < 30 | Ct value >= 30 | |
| Nhập cảnh | 138 | 57 | 195 (77,7%) |
| Cộng đồng | 34 | 22 | 56 (22,3%) |
| Tổng số | 172 (68,5%) | 79 (31,5%) | 251 (100%) |

Trong tổng số 251 mẫu dương tính, giá trị Ct trung bình là 28 chu kỳ (IQR 22,3-32, 14-38). Trong đó, 77,7% (195/251) mẫu bệnh nhân nhập cảnh từ Trung Quốc, Anh, các nước Châu Âu và Mỹ; tỷ lệ mẫu cộng đồng là 23,3% (56/251). Kết quả Realtime RT-PCR cho thấy 172/251 mẫu (68,5%) có giá trị Ct <30. Các ca SARS-CoV-2 nhập cảnh và các ca trong cộng đồng có giá trị Ct < 30 lần lượt là 70,7% và 60,7%, không có sự khác biệt (p > 0,05) (Bảng 3.1).

Trong quá trình điều trị COVID-19, những bệnh nhân dương tính với SARS-CoV-2 đã được lấy mẫu nhiều lần để theo dõi quá trình hồi phục của bệnh nhân. Khoảng thời gian giữa hai lần lấy mẫu là trung bình 4 ngày. Trong 251 mẫu dương tính giai đoạn này có 236 mẫu có kết quả dương tính và 15 mẫu âm tính trong lần lấy mẫu đầu tiên. Trong đó, các mẫu dương tính có giá trị Ct<30 là 66,9%, Ct>=30 là 23,1%. Tổng số có 159/251 mẫu bệnh phẩm SARS-CoV-2 thứ hai được gửi đến Khoa Virus – Viện VSDTTƯ, trong đó có 87/159

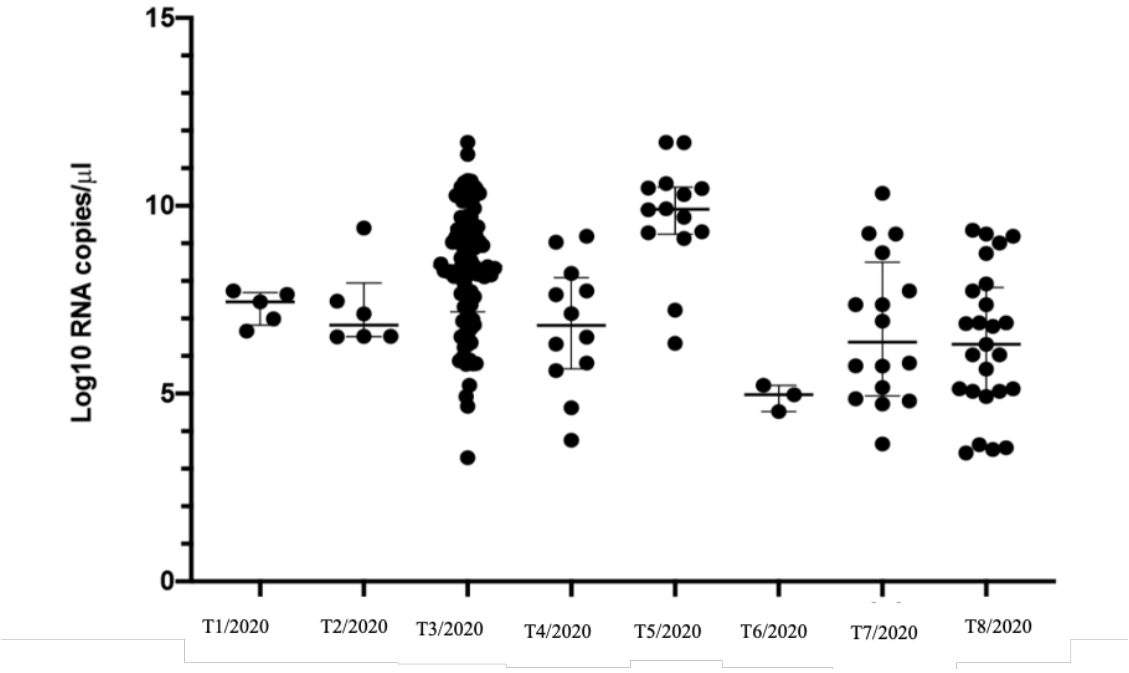
(54,7%) trường hợp dương tính. Đến lần lấy mẫu thứ 10, vẫn có 1 trường hợp cho kết quả dương tính với SARS-CoV-2, với thời gian kể từ khi thu thập mẫu lần 1 đến lần 10 là 40 ngày

Tỷ lệ dương tính từ mẫu thứ 3 đến mẫu thứ 10 giảm từ 21,2% (31/146) xuống 13,3% (2/15). Ở các lần xét nghiệm đầu tiên, phần lớn mẫu dương tính có giá trị Ct <30, và theo thời gian, tỷ lệ mẫu với giá trị Ct <30 giảm dần và số lượng mẫu dương tính giảm dần theo từng lần xét nghiệm (Bảng 3.2).

**Bảng 3. 2. Kết quả các mẫu dương tính và giá trị Ct theo số lần thu thập mẫu**

| Số lần xét nghiệm | Giá trị Ct | | | | Kết quả | | | Tổng số mẫu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ct <30 | | Ct>=30 | | Dương tính | | Âm tính | |
| | n | % | n | % | n | % | | |
| 1 | 158 | 66,9 | 78 | 23,1 | 236 | 94,0 | 15 | 251 |
| 2 | 66 | 75,8 | 21 | 24,2 | 87 | 54,7 | 72 | 159 |
| 3 | 17 | 54,8 | 14 | 45,2 | 31 | 21,2 | 115 | 146 |
| 4 | 7 | 58,3 | 5 | 41,7 | 12 | 13,9 | 74 | 86 |
| 5 | 1 | 20,0 | 4 | 80,0 | 5 | 8,3 | 55 | 60 |
| 6 | 1 | 50,0 | 1 | 50,0 | 2 | 3,8 | 53 | 55 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 37 |
| 8 | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 | 10,7 | 25 | 28 |
| 9 | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 | 15,7 | 16 | 19 |
| 10 | 0 | 0 | 1 | 100,0 | 1 | 13,3 | 13 | 14 |

***Tải lượng RNA SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm dương tính**



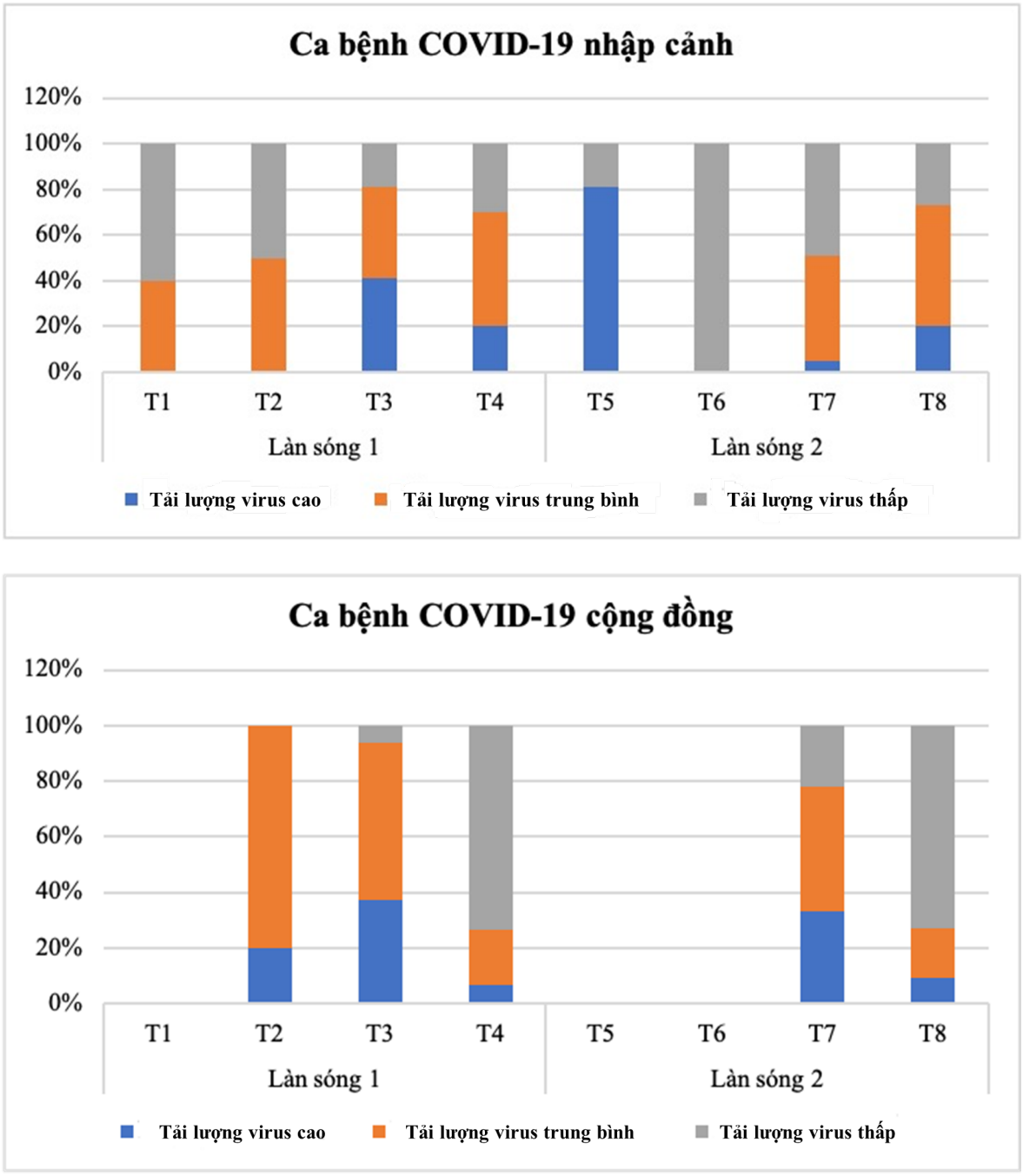

**Hình 3. 3. Tải lượng RNA SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính, 1/2020-8/2020**

Nghiên cứu phân tích tải lượng virus của 236/251 mẫu dương tính trong lần thu thập mẫu đầu tiên. Kết quả dữ liệu phân tích cho giá trị tải lượng virus trung bình là $8{,}4.10^7$ copies/µl, mẫu có giá trị tải lượng virus thấp nhất là $2{,}29.10^6$ copies/µl, giá trị tải lượng virus cao nhất là $1{,}83.10^9$ copies/µl (IQR: $2{,}29.10^6$ - $1{,}83.10^9$ copies/µl, $1.95.10^3$ – $4.95.10^{11}$) (Hình 3.3). Trên cơ sở đó, nghiên cứu quy ước:

Tải lượng virus cao: tải lượng virus trong các mẫu lâm sàng > $1{,}83.10^9$ copies/µl (giá trị Ct < 22);

Tải lượng virus trung bình: $2{,}29.10^6$ copies/µl <tải lượng virus < $1{,}83.10^9$ copies/µl (giá trị 22 ≤ Ct < 32);

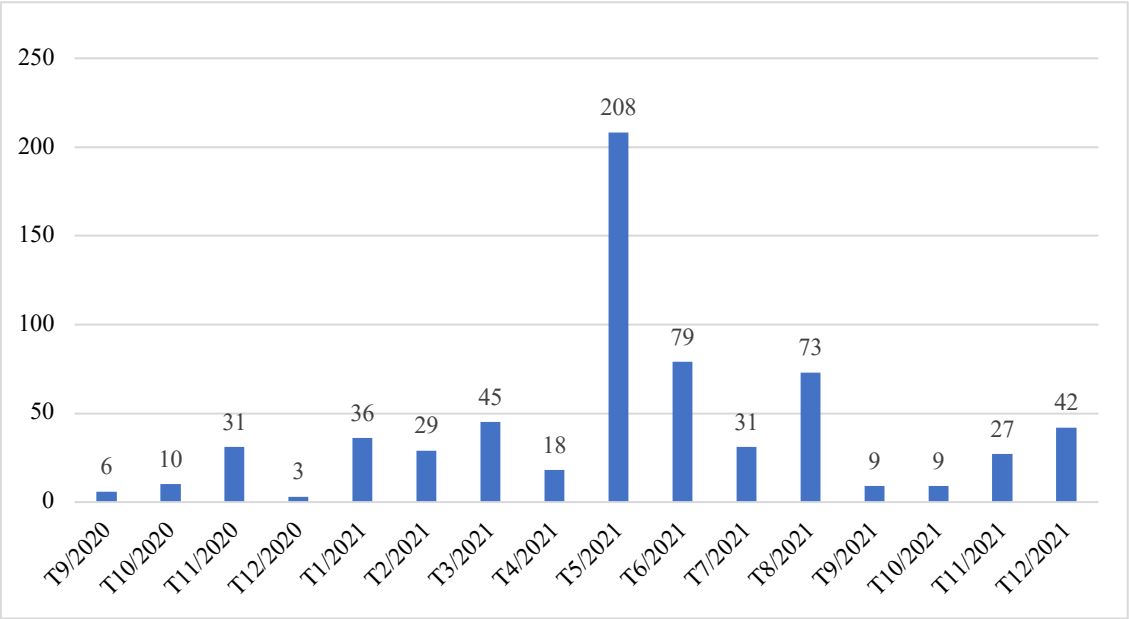
Tải lượng virus thấp: tải lượng virus trong các mẫu lâm sàng <2,29.$10^6$ copies/µl (giá trị Ct ≥ 32)




**Hình 3. 4. Phân tích tải lượng virus trong mẫu bệnh lâm sàng theo nhóm nhập cảnh và nhóm cộng đồng tại Việt Nam**

Hình 3.4 cho thấy tải lượng virus thấp, trung bình và cao tỷ lệ đối với các trường hợp nhiễm COVID-19 nhập cảnh và tại cộng đồng. Ở nhóm ca nhập cảnh, tỷ lệ nhiễm virus chung ở mức độ thấp, trung bình và cao là 44%, 35% và 21%. Các mẫu có tải lượng virus ở mức độ thấp và trung bình xuất hiện trong cả 8 tháng, các mẫu có tải lượng virus cao được xác định nhiều vào tháng 3 (41%), tháng 4 (20%) và tháng 5 (81%). Đối với nhóm cộng đồng, số liệu tải lượng virus cho thấy trong 3 tháng giai đoạn 1 và 2 tháng giai đoạn 2 (tháng 7, 8), tỷ lệ ở mức độ thấp, trung bình và cao lần lượt là 35%, 44% và 21%.

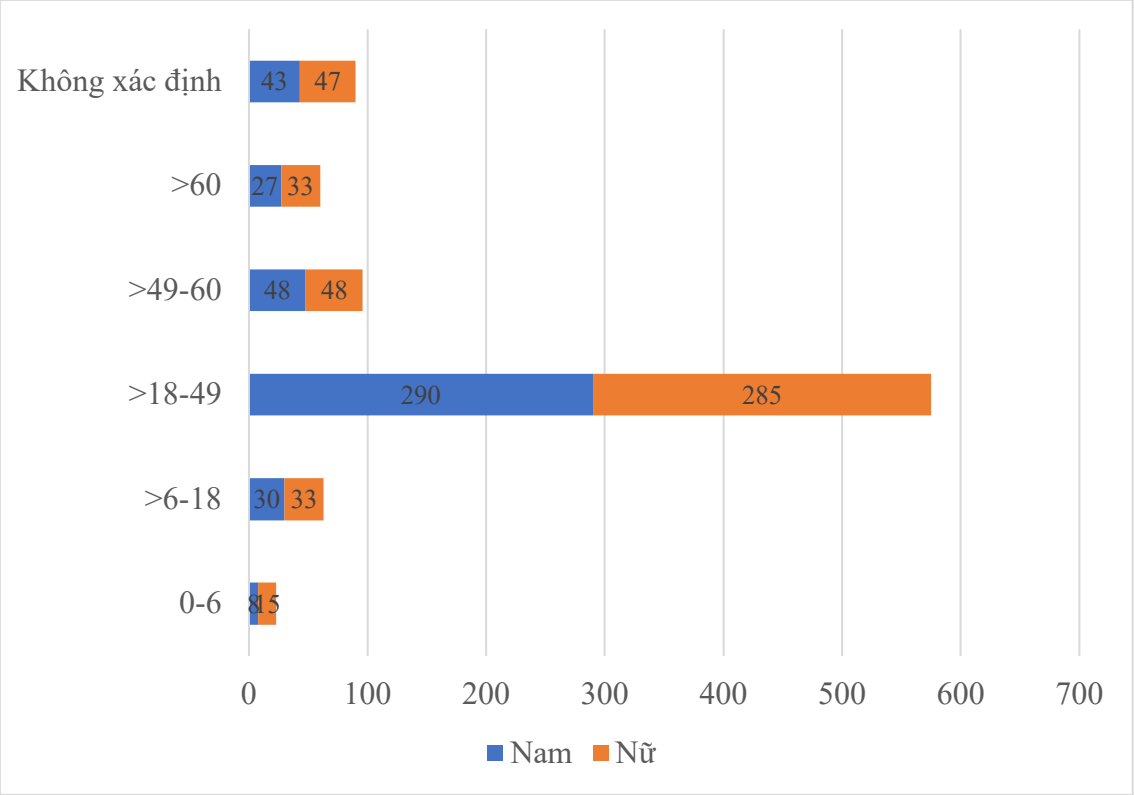
### *3.1.3. Phân bố các ca nhiễm SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020-2021*




**Hình 3. 5. Các trường hợp khẳng định dương tính phân bố theo thời gian, 9/2020 –12/2021**

Kể từ tháng 9/2020, các mẫu được xét nghiệm dương tính với SARS-CoV-2 tại các Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật các tỉnh/thành phố và các bệnh viện, được gửi tới Viện VSDTTƯ để thực hiện xét nghiệm khẳng định. Tổng số mẫu được khẳng định dương tính là 656 mẫu. Đầu năm 2021, số ca dương

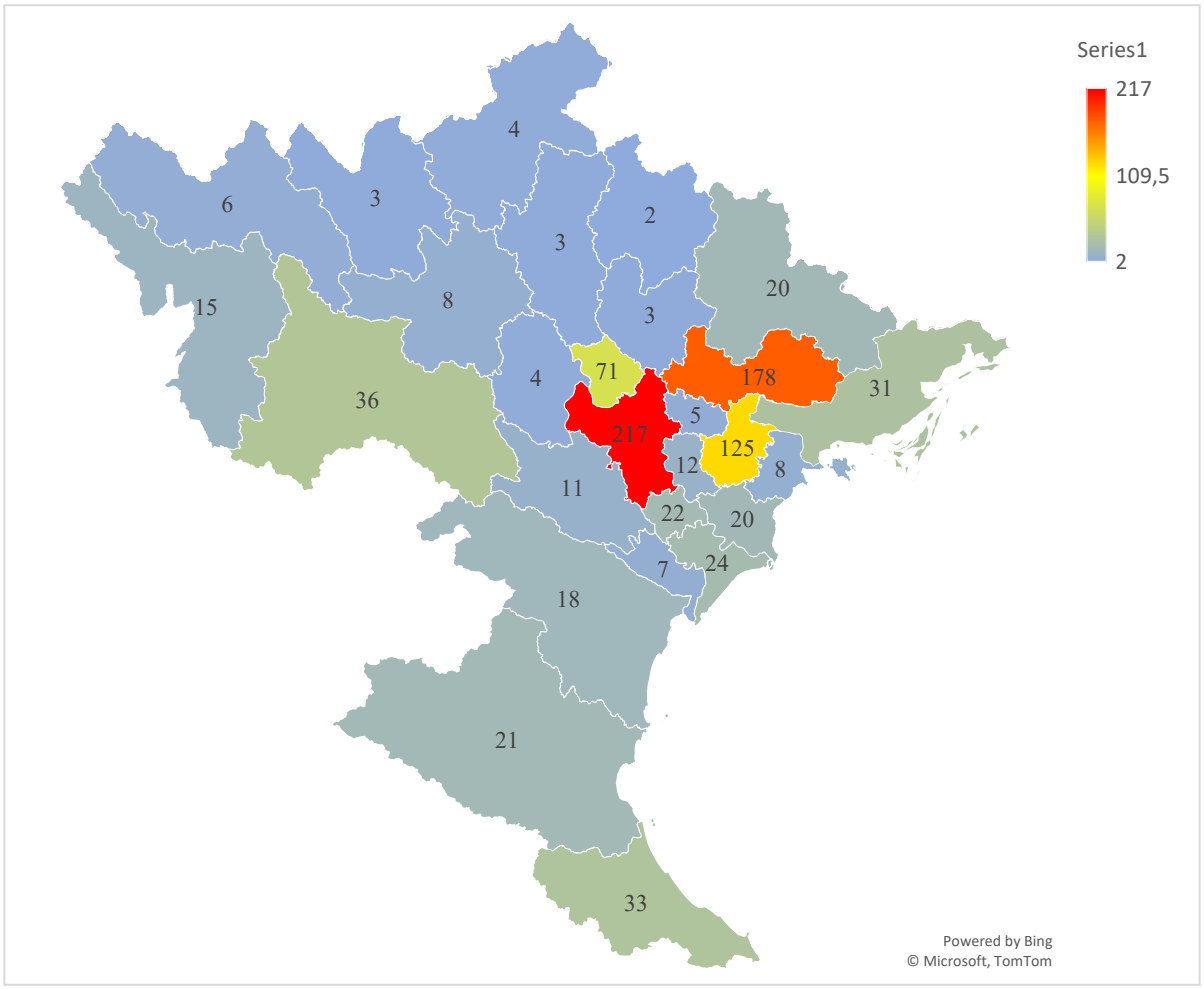
tính tăng cùng thời điểm dịch COVID-19 bùng phát tại Hải Dương, từ tháng 1/2021 - 3/2021 với số ca khẳng định dương tính theo tháng lần lượt là 36, 29 và 45 trường hợp. Tháng 5/2021 là tháng có số mẫu dương tính cao nhất với 208 mẫu, cao gấp nhiều lần so với các tháng trước đó. Đây chính là thời điểm bùng phát dịch tại Bắc Giang và Bắc Ninh, là hai tỉnh có rất nhiều khu công nghiệp với số lượng tập trung công nhân lớn (Hình 3.5). Dịch xảy ra tại Bắc Giang, Bắc Ninh ghi nhận lớn hơn tại Hải Dương. Các tháng tiếp theo vào tháng 6, 7, 8/2021 vẫn tiếp tục ghi nhận các ca bệnh dương tính cao.




**Hình 3. 6. Phân bố các ca dương tính SARS-CoV-2 theo độ tuổi và giới tính, 2020-2021**

Tổng số mẫu dương tính SARS-CoV-2 trong 2 năm 2020-2021 là 907 mẫu. Sự phân bố về giới tính tương đối đều ở hầu hết các nhóm tuổi. Có 91/907 (10%) ca nhiễm SARS-CoV-2 không có thông tin về nhóm tuổi. Nhóm >18-49 tuổi

chiếm số lượng ca nhiễm cao nhất so với các nhóm tuổi khác 575/907 (63,4%). Nhóm tuổi trẻ em 0-6 tuổi chiếm tỷ lệ thấp nhất 2,5%, và nhóm người cao tuổi >60 là 6,6% (Hình 3.6).




**Hình 3. 7. Phân bố các ca dương tính SARS-CoV-2 theo tỉnh, 2020-2021**

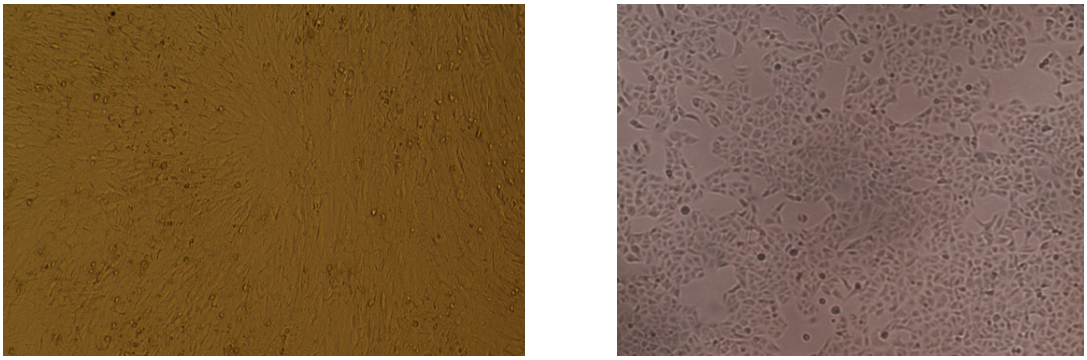
Trong 2 năm 2020-2021, 4 tỉnh/thành phố có số ca nhiễm SARS-CoV-2 nhiều nhất là Hà Nội (217 ca), Bắc Giang (178 ca), Hải Dương (125 ca) và Vĩnh Phúc (71 ca), 6 tỉnh có số mắc > 20 ca như Nghệ An, Hà Tĩnh, Thái Bình, Sơn La, Quảng Ninh, Lạng Sơn. Các tỉnh còn lại có số ca mắc < 20 ca, và một số tỉnh chỉ ghi nhận ca bệnh rất thấp như Lào Cai (3), Tuyên Quang (3), Thái Nguyên (3) Bắc Kạn (2) (Hình 3.7).

### *3.1.4. Phân lập SARS-CoV-2*

Trong những tháng đầu của vụ dịch, nghiên cứu đã sử dụng 81/251 (32,3%) mẫu dương tính, được bảo quản thích hợp và có thể tích đủ để gây nhiễm trên tế bào Vero E6. Kết quả thu được 29 (35,8%) chủng SARS-CoV-2. Trong đó, 20/29 mẫu xuất hiện hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE) trong khoảng thời gian từ 72 đến 96 giờ, và 9/29 mẫu còn lại xuất hiện CPE ở lần cấy truyền thứ 2. Trong 28 mẫu có giá trị Ct <20, 18 mẫu (64,3%) phân lập được virus; 20 trường hợp có giá trị Ct là 20–25 có 10 mẫu (50%) phân lập được virus và không có virus nào được phân lập từ các mẫu có giá trị Ct >30 (n=13) (Bảng 3.3).

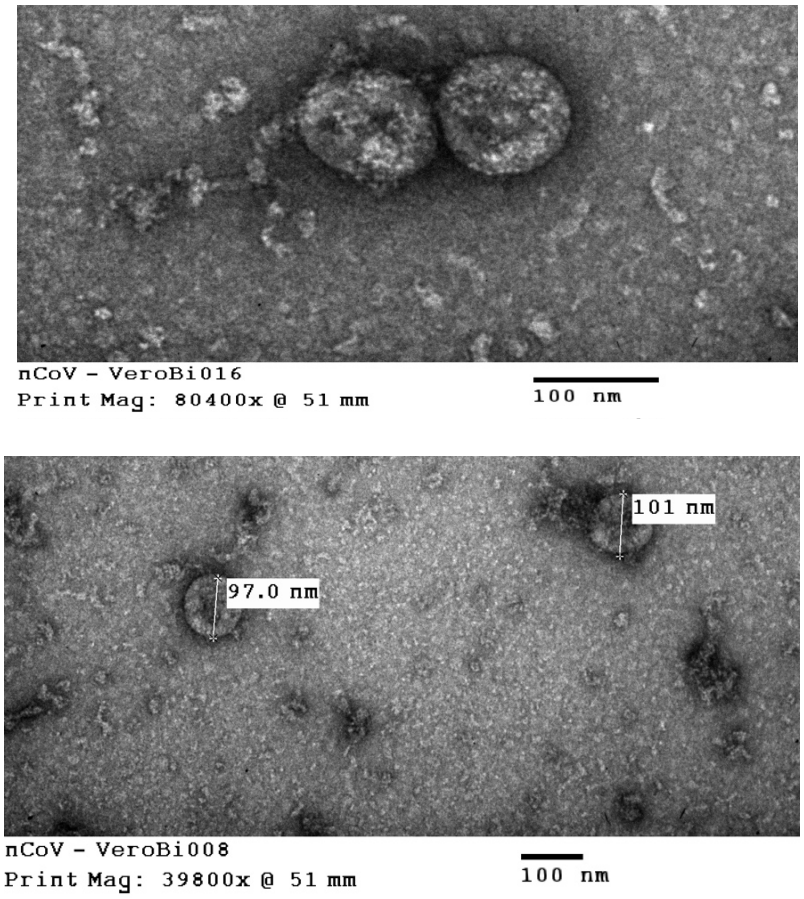
**Bảng 3. 3. Kết quả phân lập SARS-CoV-2 trên tế bào Vero E6 và mối tương quan với giá trị Ct**

| Giá trị Ct | Số lượng mẫu phân lập | Số mẫu có CPE n (%) |
|---|---|---|
| ≤20 | 28 | 18 (64,3) |
| 21–25 | 20 | 10 (50,0) |
| 26–30 | 20 | 1 (5,0) |
| >30 | 13 | 0 (0) |
| **Tổng số** | **81** | **29 (35,8)** |



A B

***Hình 3. 8. A. Hình ảnh tế bào Vero – E6 chưa gây nhiễm. B. Hình ảnh SARS-CoV-2 nhân lên trong tế bào Vero – E6 sau 72h***




**Hình 3. 9. Hình ảnh SARS-CoV-2 trong dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)**

## 3.2. PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN THẾ HỆ MỚI, 2020-2021

### *3.2.1. Thông tin các mẫu giải trình tự*

**Bảng 3. 4. Số mẫu thực hiện giải trình tự gen bằng Illumina Iseq100, 2020-2021**

| STT | | Tỉnh/thành phố | Số mẫu (n) |
|---|---|---|---|
| 1 | Miền Bắc | Hà Nội | 145 |
| 2 | | Bắc Giang | 92 |
| 3 | | Hải Dương | 64 |
| 4 | | Vĩnh Phúc | 29 |
| 5 | | Hà Nam | 26 |
| 6 | | Nam Định | 19 |
| 7 | | Thái Bình | 18 |
| 8 | | Quảng Ninh | 16 |
| 9 | | Sơn La | 14 |
| 10 | | Điện Biên | 12 |
| 11 | | Phú Thọ | 10 |
| 12 | | Lạng Sơn | 9 |
| 13 | | Ninh Bình | 7 |
| 14 | | Yên Bái | 5 |
| 15 | | Bắc Ninh | 5 |
| 16 | | Hưng Yên | 2 |
| 17 | | Lai Châu | 1 |
| 18 | | Thái Nguyên | 1 |
| 19 | | Hải Phòng | 1 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 20 | Miền Trung | Đà Nẵng | 60 |
| 21 | | Nghệ An | 24 |
| 22 | | Hà Tĩnh | 20 |
| 23 | | Thanh Hoá | 15 |
| **Tổng** | | | **595** |

Tổng số 595/907 (65,6%) mẫu có giá trị Ct < 30 đủ tiêu chuẩn được lựa chọn để thực hiện giải trình tự gen, đại diện cho 19 tỉnh ở miền Bắc và 4 tỉnh ở miền Trung (Đà Nẵng, Nghệ An, Hà Tĩnh và Thanh Hoá). Các tỉnh/thành phố được thực hiện giải trình tự với số lượng mẫu nhiều là nơi xảy ra các vụ dịch lớn như Vĩnh Phúc (29 mẫu), Đà Nẵng (60 mẫu), Hải Dương (64 mẫu) và Bắc Giang (92 mẫu), Hà Nội (145 mẫu) (Bảng 3.4).

Trong số 595 mẫu giải trình tự gen có 549/595 (92,3%) mẫu thu được toàn bộ trình tự hệ gen SARS-CoV-2; 46/595 (7,7%) mẫu không thu được toàn bộ trình tự hệ gen, có các đoạn khuyết (gap) từ vài chục tới vài trăm nucleotide trên đoạn gen ORF, S hoặc M.

### *3.2.2. Đặc điểm phân tử biến thể SARS-CoV-2 tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 2020-2021*

Hiện nay có 3 hệ thống phân loại SARS-CoV-2, có sự tương đồng với nhau, trong đó hệ thống phân loại Pangolin được sử dụng phổ biến nhất:

+ Phân loại theo TCYTTG (biến thể): được kí hiệu bằng chữ Hy Lạp: Alpha, Beta, Delta, Omicron…;

+ Phân loại theo Nexstrain: clade (dòng), theo năm xuất hiện: 19A, 19B, 20A, 20B, 21A, 21I…;

+ Phân loại theo Pangolin: lineage/sublineage (biến thể): B, B1.1, B1.1.7…

**Bảng 3. 5. Các biến thể SARS-CoV-2 tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 2020 - 2021**

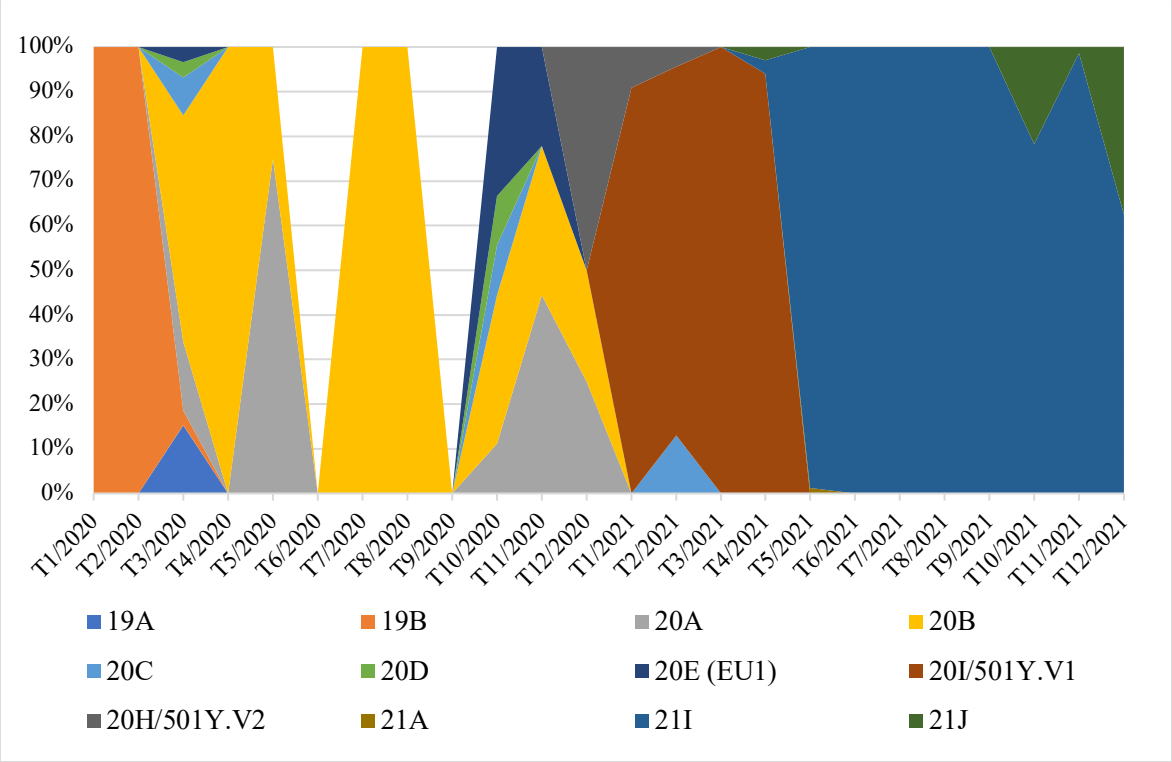
| Phân loại TCYTTG (Biến thể) | Phân loại theo Nextstrain (Clade - Dòng) | Phân loại theo Pangolin (Lineage - Biến thể) | Mẫu cộng đồng | Mẫu nhập cảnh | Tổng |
|---|---|---|---|---|---|
| | 19A | B, B.3, B.4, B.39, B.40 | 7 | 2 | 9 |
| | 19B | A, A.5 | 5 | 3 | 8 |
| | 20A | B1, B1.22, B.1.566, B.1.36.8, B.1.36.22, B.1.36.18, B.1.36.36 | 9 | 15 | 24 |
| | 20B | B.1.1.317, B.1.1.284, B.1.1, B.1.1.274, B.1.1.25, B.1.1.306, B.1.1.10 | 68 | 17 | 85 |
| | 20C | B.1, B.1.577, B.1.637 | 7 | 2 | 9 |
| | 20D | B.1.1.1, C.16 | 1 | 2 | 3 |
| | 20E (EU1) | B.1.177.8, B.1.177.54 | 2 | 3 | 5 |
| Alpha | 20I/501Y.V1 | B.1.1.7 | 111 | 7 | 118 |
| Beta | 20H/501Y.V2 | B.1.351 | 1 | 5 | 6 |
| Delta | 21A | B.1.617.2 | 0 | 1 | 1 |
| | 21I | AY.54, AY.57, AY.60, AY.75, AY.80, B.1.617.2 | 309 | 4 | 313 |
| | 21J | AY.23, AY.79, AY.85, AY.122, B.1.617.2 | 10 | 4 | 14 |
| | **Tổng số** | | **530** | **65** | **595*** |

** Danh sách mẫu SARS-CoV-2 giải trình tự trong nghiên cứu đã được công bố trên GISAID (Phụ lục 4)*

Kết quả giải trình tự gen Illumina Iseq 100 phân tích theo hệ thống phân loại của TCYTTG đã xác định được 3 biến thể SARS-CoV-2 là virus gốc Vũ Hán, biến thể Alpha, Beta và Delta lưu hành ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020-2021 (Bảng 3.5). Virus gốc Vũ Hán - Hu D614 được xác định 143/595 mẫu (24,0%), biến thể Alpha có 118 mẫu (19,9%), biến thể Beta với 6 mẫu (1,0%) và biến thể Delta có 328 mẫu (55,1%).

Phân tích sự lưu hành của các biến thể/dòng SARS-CoV-2 ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam cho thấy dòng 20I-501Y.V1/B.1.1.7 (biến thể Alpha) có số lượng nhiều nhất với 118 mẫu, chiếm 19,9%; phần lớn các trường hợp nhiễm dòng này đều có liên quan đến cộng đồng trong nước (111/118 trường hợp). Dòng phổ biến thứ hai là dòng 20B với 85 trường hợp, chiếm 14,3% và 68/85 mẫu từ cộng đồng trong nước (Bảng 3.5). Dòng 20A xuất hiện 24 trường hợp, trong đó có 15 trường hợp nhập cảnh từ các nước như Anh, Mỹ, Ấn Độ. Ngoài ra, các dòng SARS-CoV-2 khác nhau bao gồm 19A, 19B, 20C, 20D, 20E (EU1) và 20H/501Y.V2 được tìm thấy ở cả cộng đồng trong nước và các mẫu nhập cảnh quốc tế với số lượng <10 trường hợp. Đặc biệt, dòng 20H-501Y.V2 (biến thể Beta) đã được tìm thấy trong 6 ca COVID-19, trong đó 5/6 ca bệnh có nguồn gốc từ Nam Phi là các ca nhập cảnh, 1 ca trong cộng đồng tại Việt Nam.

Tính đến làn sóng dịch thứ 4 (27/4/2021), dòng 21A, 21I, 21J (biến thể Delta) xuất hiện với mức độ lây lan nhanh, lan rộng ra khắp các tỉnh/thành phố, tập trung tại 2 ổ dịch lớn là Bắc Giang và Hà Nội. Trong đó, dòng 21I có 6 biến thể virus B.1.617.2, AY.54, AY.57, AY.60, AY.75 và AY.80 với số mẫu ghi nhận cao 313/328 mẫu (95,4%) (Bảng 3.5)




**Hình 3. 10. Phân bố các dòng SARS-CoV-2, 2020-2021 (Nextstrain)**

Theo phân loại của Nexstrain, 12 dòng SARS-CoV-2 (clade) được ghi nhận trong nghiên cứu. Trong đó, virus gốc Vũ Hán - Hu D164 có 7 dòng (19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20D, 20E-EU1), biến thể Alpha (20I/501Y.V1) và Beta (20H/501Y.V2) mỗi biến thể có 1 dòng; biến thể Delta có 3 dòng (21A, 21I, 21 J). Trong mỗi dòng theo phân loại Nextstrain lưu hành các biến thể SARS-CoV-2 khác nhau theo phân loại Pangolin. Trong đó, dòng 20A, 20B và 21I xuất hiện nhiều biến thể nhất với 6 - 7 biến thể khác nhau (Bảng 3.5).

Ở làn sóng dịch đầu tiên (tháng 1/2020-3/2020), dòng 19B xuất hiện đầu tiên và dần được thay thế bằng 3 dòng 19A, 20A, 20B. Hai dòng 20A và 20B tiếp tục lưu hành chủ đạo trong làn sóng dịch thứ 2. Đến làn sóng dịch thứ 3 (1/2021- 4/2021), dòng Alpha/20I xuất hiện và đến cuối tháng 4/2021 biến thể Delta được phát hiện tại Việt Nam, phát triển thành 1 dòng AY.57/21I đặc trưng lưu hành ở hầu hết các tỉnh/thành phố (Hình 3.10).

**Bảng 3. 6. Phân bố các biến thể SARS-CoV-2 theo tỉnh/thành phố trong 4 làn sóng dịch, 2020-2021**

| Tỉnh/ Tp | Số ca | Theo Nextstrain (Dòng) | Theo Pangolin (Biến thể) |
|---|---|---|---|
| **Làn sóng dịch thứ nhất COVID-19 (Từ 23/01 đến 24/07/2020) - 9 tỉnh/thành phố** | | | |
| Hà Nội | 48 | 19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20D | A, B, B.1, B.1.1, B.1.1.1, B.1.1.10, B.1.1.317, B.1.22, B.1.566, B.39, B.40 |
| Thanh Hoá | 14 | 20B | B.1.1.25 |
| Thái Bình | 12 | 20A, 20B | B.1, B.1.1 |
| Ninh Bình | 7 | 19A, 20A, 20B, 20D | B, B.1, B.1.1, B.1.1.1, B3 |
| Vĩnh Phúc | 6 | 19A, 19B, 20B | A, B.1.1, B.1.1.317, B4 |
| Quảng Ninh | 2 | 20B | B.1.1 |
| Lai Châu | 1 | 20B | B.1.1 |
| Hưng Yên | 1 | 19B | A |
| Thái Nguyên | 1 | 20B | B.1.1 |
| **Làn sóng dịch thứ hai COVID-19 (Từ 25/07/2020 đến 27/01/2021) - 12 tỉnh/thành phố** | | | |
| Hải Dương | 39 | 20A, 20B, 20E, 20I | B.1.1, B.1.1.284, B.1.1.317, B.1.1.417, B.1.1.7, B.1.177.8, B.1.36.36, B.1.36.8 |
| Đà Nẵng | 17 | 20B | B.1.1 |
| Hà Nội | 10 | 20A, 20B, 20H | B.1, B.1.1, B.1.1.306, B.1.351 |
| Bắc Giang | 8 | 20I | B.1.1.7 |
| Quảng Ninh | 7 | 20I | B.1.1.7 |
| Nam Định | 6 | 20A, 20B, 20E | B.1, B.1.1, B.1.1.274, B.1.1.317, B.1.177.54 |
| Hà Nam | 3 | 20A, 20B | B.1.1, B.1.36.18, B.1.36.22 |
| Lạng Sơn | 2 | 20B | B.1.1 |
| Bắc Ninh | 1 | 20D | C.16 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Hưng Yên | 1 | 20C | B.1.577 |
| Thái Bình | 1 | 20B | B.1.1 |
| Thanh Hoá | 1 | 20B | B.1.1 |
| **Làn sóng dịch thứ ba COVID-19 (Từ 28/01 đến 26/04/2021) - 6 tỉnh/thành phố** | | | |
| Đà Nẵng | 29 | 20I | B.1.1.7 |
| Hà Nội | 21 | 20C, 20I | B1.1.7, B.1.637 |
| Hải Dương | 14 | 20I, 20H | B.1.1.7, B.1.351 |
| Hà Nam | 12 | 20I | B.1.1.7 |
| Hà Tĩnh | 2 | 20I | B.1.1.7 |
| Hải Phòng | 1 | 20I | B.1.1.7 |
| **Làn sóng dịch thứ tư COVID-19 (Từ 27/04 đến hết 2021) - 17 tỉnh/thành phố** | | | |
| Bắc Giang | 84 | 21I | AY.57 |
| Hà Nội | 66 | 21A, 21I, 21J | AY.57, AY.75, AY.79, AY.80, B.1.617.2 |
| Nghệ An | 24 | 21I | AY.57 |
| Vĩnh Phúc | 23 | 21I | AY.57, AY.80, B.1.617.2 |
| Hà Tĩnh | 18 | 21I | AY.57 |
| Sơn La | 14 | 21I | AY.57 |
| Đà Nẵng | 14 | 21I | AY.57 |
| Nam Định | 13 | 21I, 21J | AY.57, AY.23 |
| Điện Biên | 12 | 21I, 21J | AY.57, AY.60, AY.85 |
| Hải Dương | 11 | 21I | AY.57 |
| Hà Nam | 11 | 21I | AY.57, B.1.617.2 |
| Phú Thọ | 10 | 21I | AY.57 |
| Lạng Sơn | 7 | 21I | AY.57 |
| Quảng Ninh | 7 | 21I, 21J | AY.57, AY.122 |
| Thái Bình | 5 | 21I | AY.57 |
| Yên Bái | 5 | 21I | AY.57, AY.54, B.1.617.2 |
| Bắc Ninh | 4 | 21I | AY.57 |

Các biến thể SARS-CoV-2 xuất hiện ở các tỉnh/thành phố khác nhau trong 4 làn sóng dịch (Bảng 3.6). Trong đó, dòng lưu hành nổi trội trong hai làn sóng dịch đầu tiên tại Việt Nam là 20A và 20B, làn sóng dịch thứ 3 là 20I/B1.1.7 và làn sóng dịch thứ 4 là 21I/AY.57.

Làn sóng dịch đầu tiên xảy ra từ 23/1/2020 đến 24/7/2020, các biến thể được phát hiện ở 9 tỉnh/thành phố ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam. Trong đó, Hà Nội có số mẫu cao nhất (48 mẫu), tiếp đến là Thanh Hóa (14 mẫu) và Thái Bình (12 mẫu). Virus lưu hành tại Hà Nội với 6 dòng 19A, 19B, 20A, 20B, 20C và 20D tương đương với 9 biến thể SARS-CoV-2 là A, B, B.1, B.1.1, B.1.1.1, B.1.1.10, B.1.1.317, B.1.22, B.1.566, B.39, B.40. SARS-CoV-2 ghi nhận tại Thanh Hoá 14/14 virus đều thuộc dòng 20B, với 1 biến thể duy nhất là B.1.1.25. Các virus lưu hành ở các tỉnh/thành phố còn lại có từ 1 - 5 biến thể (Bảng 3.6).

Làn sóng dịch thứ 2 xảy ra từ 25/7/2020 đến 27/1/2021, các biến thể ghi nhận tại 12 tỉnh/thành phố. Trong đó, dòng 20B chiếm ưu thế với 8/12 tỉnh. Hải Dương, Đà Nẵng và Hà Nội có số virus được giải trình tự gen tương ứng là 39, 17 và 10 virus. Trong đó, tại Hải Dương lưu hành 4 dòng khác nhau của SARS-CoV-2 bao gồm 20A, 20B, 20E, 20I; tại Hà Nội là 3 dòng 20A, 20B, 20H. 17 virus thu thập từ Đà Nẵng đều thuộc dòng 20B. Trong làn sóng dịch thứ 2 đã ghi nhận các trường hợp nhiễm SARS-CoV-2 thuộc dòng 20I tại Hải Dương, Bắc Giang và Quảng Ninh, và sau đó dòng 20I là dòng lưu hành chủ yếu trong làn sóng dịch thứ ba.

Làn sóng dịch thứ 3 xảy ra từ 28/12021 đến 26/4/2021, số mẫu được giải trình tự gen tại 6 tỉnh/thành phố. Đà Nẵng, Hà Nội, Hải Dương và Hà Nam có số virus được giải trình tự gen nhiều (12-29 mẫu). Dòng 20I với biến thể B.1.1.7 xuất hiện 6/6 tỉnh nghiên cứu.

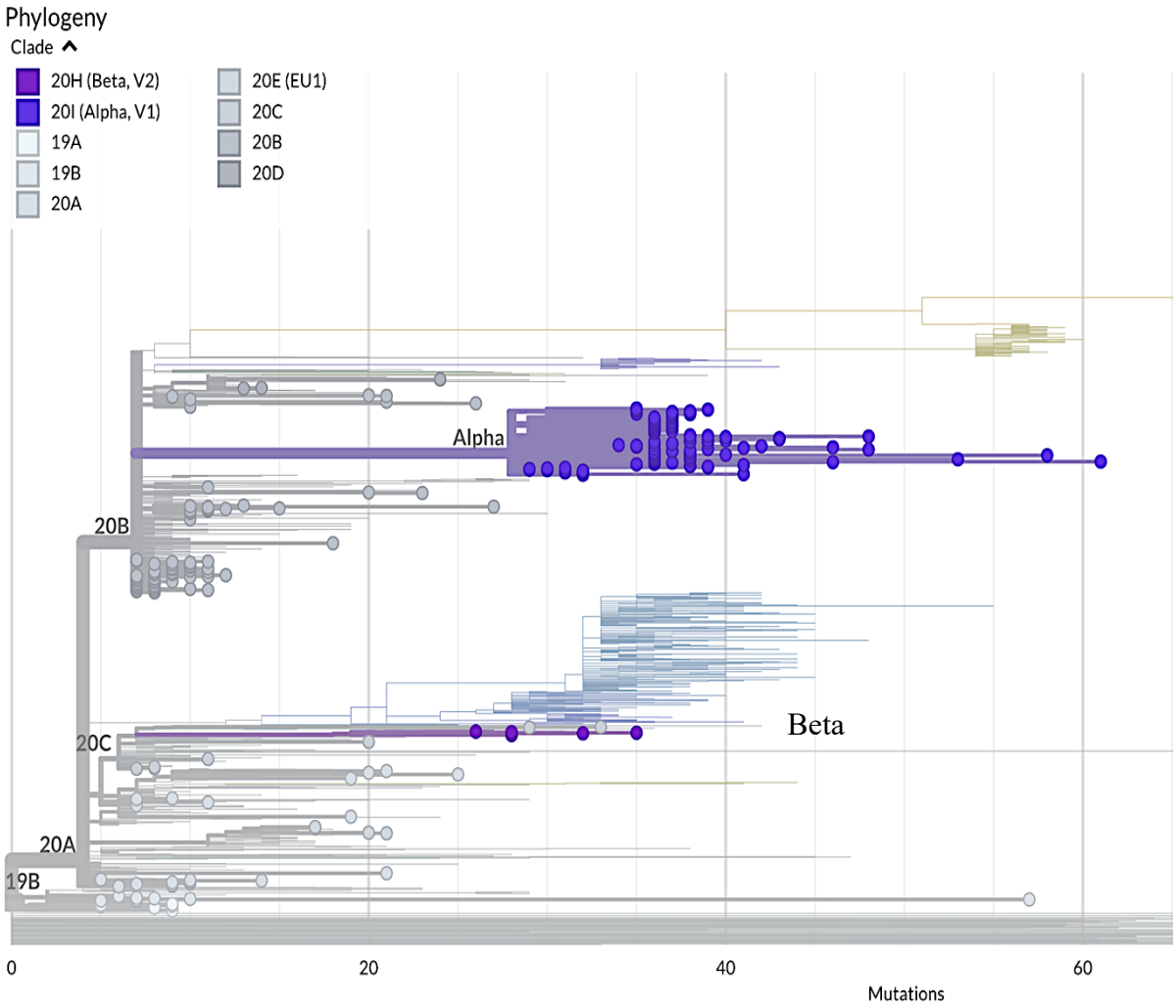
Làn sóng dịch thứ 4 bắt đầu từ 28/04/2021 với 3 dòng 21A, 21I, 20J (biến thể Delta) tương ứng với 10 biến thể lưu hành (Pangolin). Trong đó, biến thể B.1.617.2 xuất hiện từ tháng 5/2021 tại Hà Nội, Hà Nam, Vĩnh Phúc và Yên Bái. Tiếp sau đó là sự xuất hiện của biến thể AY.57, xuất hiện 17/17 tỉnh/thành phố với 297/328 mẫu (90,5%), trong đó Bắc Giang và Hà Nội ghi nhận nhiều nhất với 84 mẫu và 66 mẫu. Biến thể AY.23, AY.54, AY.60, AY.75, AY.79 AY.80, AY.85 và AY.122 lưu hành rải rác tại Nam Định, Yên Bái, Điện Biên, Hà Nội, Vĩnh Phúc, Quảng Ninh với số lượng từ 1-7 mẫu (Bảng 3.6).

### *3.2.3. Sự thay đổi nucleotide và axit amin trong hệ gen SASR-CoV-2, 2020-2021*

Cây phát sinh chủng loại hệ gen SARS-CoV-2 được xây dựng bằng công cụ Nextclade và phương pháp Maximum likelihood (ML), mô hình GTR+G với giá trị bootstrap 1000. Phân tích sự đa dạng của các biến thể SARS-CoV-2 thông qua sự thay đổi các nucleotide và axit amin trong hệ gen virus.

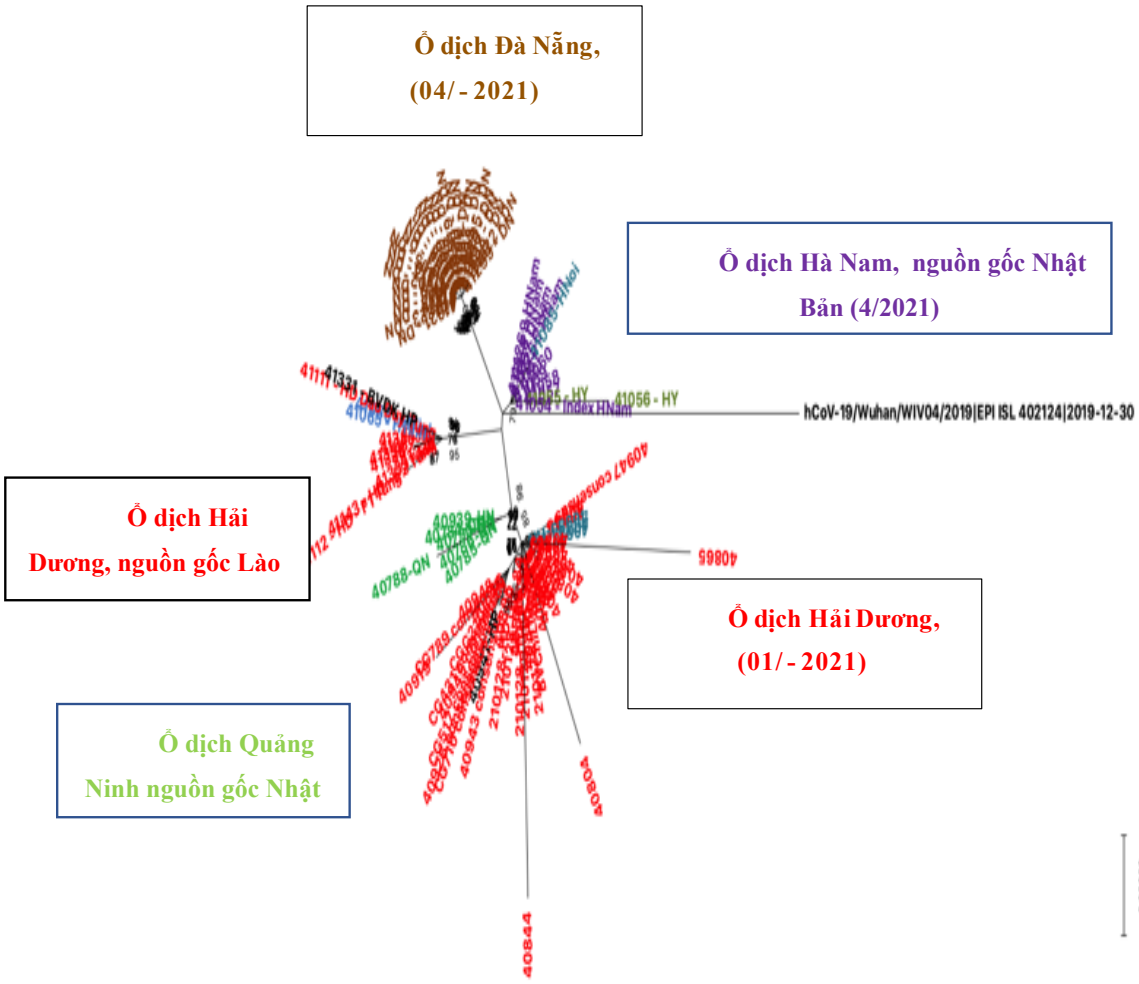
***Phân tích cây phát sinh chủng loại virus Vũ Hán, biến thể Alpha và Beta***

Cây phát sinh chủng loại hệ gen SARS-CoV-2 giai đoạn 1/2020-4/2021 được xây dựa trên 267 virus bao gồm virus Vũ Hán, biến thể Alpha và Beta. Với hơn 40 đột biến axit amin so với các biến thể xuất hiện đầu năm 2020 thuộc nhánh 19B, 20A, 20C, biến thể Alpha (20I) có nguồn gốc từ nhánh 20B và được tách ra thành một nhánh riêng biệt (Bảng 3.8 và hình 3.11). Trong nhánh Alpha cũng có thể thấy sự đa dạng của các virus với số lượng axit amin thay đổi nhưng chưa đủ điều kiện để tách thành nhánh mới.




**Hình 3. 11. Cây phát sinh chủng loại của các biến thể SARS-CoV-2 ở miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 1/2020-4/2021**

*(Công cụ phân tích giải trình tự trực tuyến Nextclade)*




**Hình 3. 12. Cây phát sinh chủng loại biến thể Alpha/20I tại các ổ dịch COVID-19, 1/2021 - 4/2021**

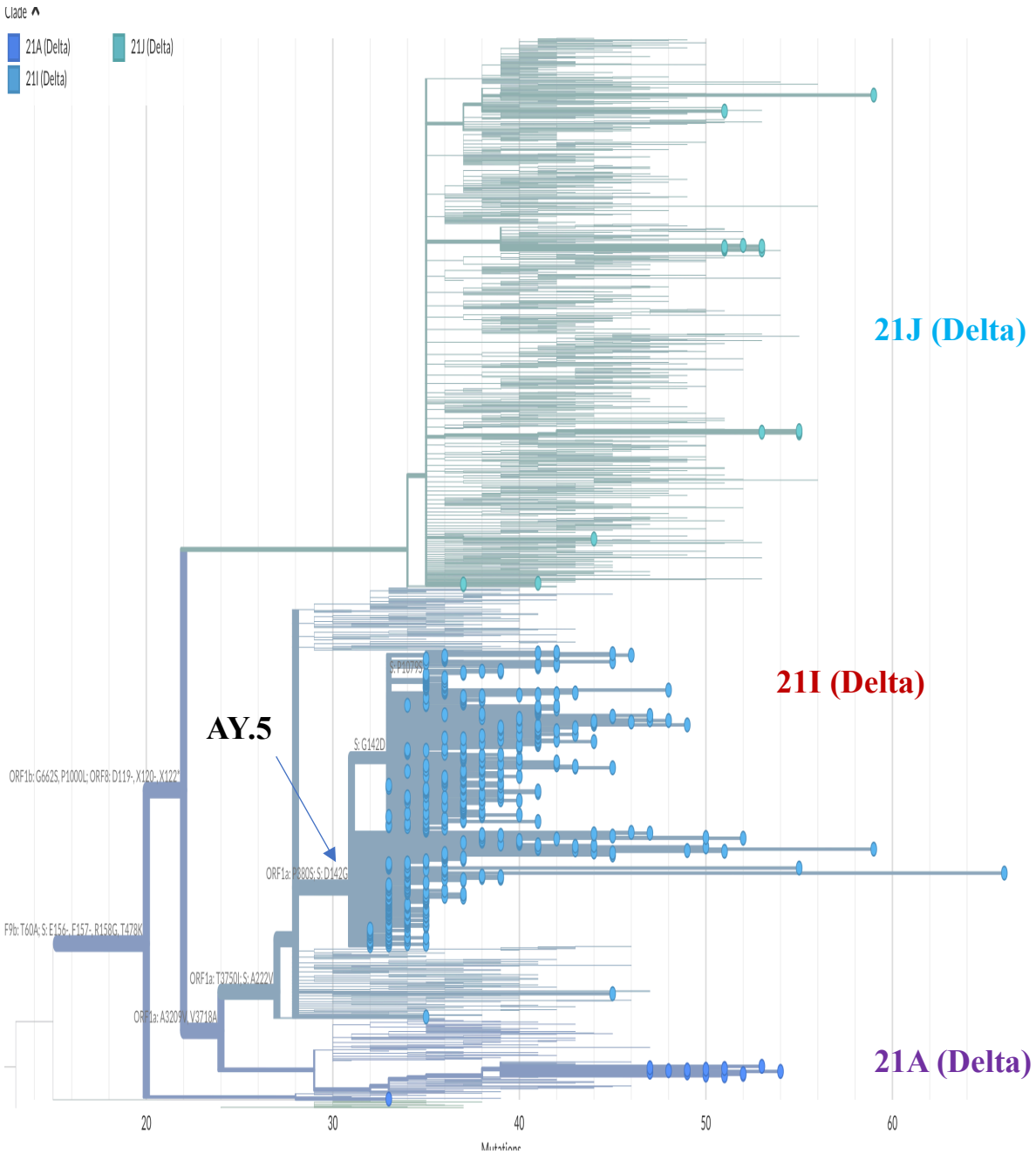
*(Phương pháp Maximum likelihood, mô hình GTR+G và bootstrap 1000) sử dụng virus gốc hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124))*

Phân tích cây phát sinh chủng loại biến thể Alpha lưu hành tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam trong cùng thời gian cho thấy có sự phân tách nhóm theo địa phương xuất hiện: Hải Dương, Quảng Ninh, Hà Nam, Đà Nẵng. Các virus gây dịch đều thuộc biến thể Alpha (B.1.1.7) - Clade 20I/501Y.V1, được phân tách thành 5 nhóm, trong đó có 2 nhóm vào tháng 1/2021 và 3 nhóm vào tháng 4/2021 tương ứng với các ổ dịch xảy ra tại thời điểm đó. Ổ dịch COVID-

19 ở Quảng Ninh và Hải Dương vào tháng 1/2021 tuy cùng thời điểm nhưng virus gây dịch mang những đặc điểm khác nhau, thể hiện trên cây phát sinh chủng loại được tách thành 2 nhóm riêng biệt với giá trị bootstrap 77 (Hình 3.12). Trong tháng 4/2021, virus gây dịch ở Đà Nẵng, Hải Dương và Hà Nam, trong đó SARS-CoV-2 lưu hành tại Đà Nẵng tạo thành một nhóm riêng biệt, tách biệt với hệ gen SARS-CoV-2 tại Hải Dương và Hà Nam với giá trị bootstrap 90.

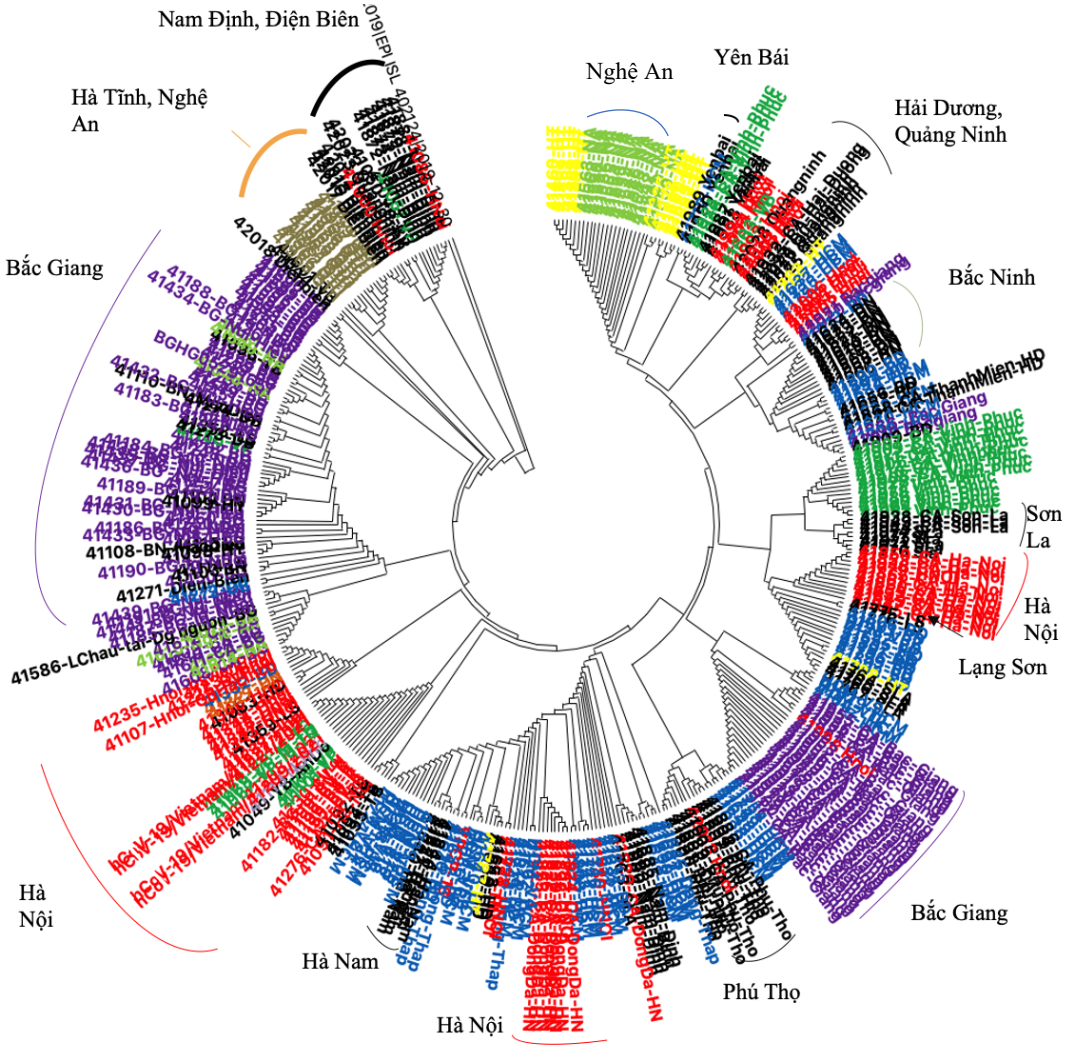
***Phân tích cây phát sinh chủng loại biến thể Delta***

Các virus gây dịch tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam trong thời gian 4/2021-12/2021 thuộc biến thể Delta được tách thành 3 dòng (clade) 21A, 21I và 21J. Trong đó, dòng 21A tương đương với B.1.617.2 được xác định là dòng virus gốc trong biến thể Delta. Biến thể AY.54, AY.57, AY.60, AY.75 và AY.80 nằm trong dòng 21I; biến thể AY.23, AY.79, AY.85 và AY.122 thuộc dòng 21J (Hình 3.13).




**Hình 3. 13. Cây phát sinh chủng loại biến thể Delta lưu hành tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 4/2021-12/2021**

*(Công cụ phân tích giải trình tự trực tuyến Nextclade).*




**Hình 3. 14. Cây phát sinh chủng loại biến thể Delta lưu hành tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 2021**

*(Phương pháp Maximum likelihood, mô hình GTR+G và bootstrap 1000) sử dụng virus gốc hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124))*

Cây phát sinh chủng loại biến thể Delta xây dựng dựa trên 328 virus ở 17 tỉnh/thành phố lưu hành tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam được lựa chọn trong nghiên cứu và tham khảo trình tự các virus lưu hành tại khu vực miền Nam trên GISAID như thành phố Hồ Chí Minh, Đồng Tháp, Bình Dương (Hình 3.14). Cây phát sinh chủng loại thể hiện sự đa dạng của SARS-CoV-2.

Virus ghi nhận nhiều nhất là Bắc Giang với 84 virus và Hà Nội với 57 virus tuy được xác định đều thuộc biến thể AY.57 nhưng được chia thành những nhóm nhỏ khác nhau (Bảng 3.6 và hình 3.14). Virus lưu hành tại Hà Nội được chia thành 6 nhóm trên cây phát sinh chủng loại, các virus trong từng nhóm có sự tương đồng cao với nhau và với các virus có nguồn gốc từ tỉnh khác như virus ghi nhận tại Vĩnh Phúc, thành phố Hồ Chí Minh. Virus lưu hành tại Bắc Giang được chia thành 2 nhóm lớn và có sự giao thoa với các virus tại Vĩnh Phúc, Hải Dương và Hà Nội. Các virus từ Nghệ An, Hà Tĩnh có sự tương đồng với nhau và tạo thành một nhóm riêng biệt trên cây phát sinh chủng loại. Các virus nhóm gốc 21A (B.1.617.2) gồm virus từ Yên Bái, Vĩnh Phúc, Hà Nội có sự tương đồng cao nằm trong cùng một nhóm (Hình 3.14).

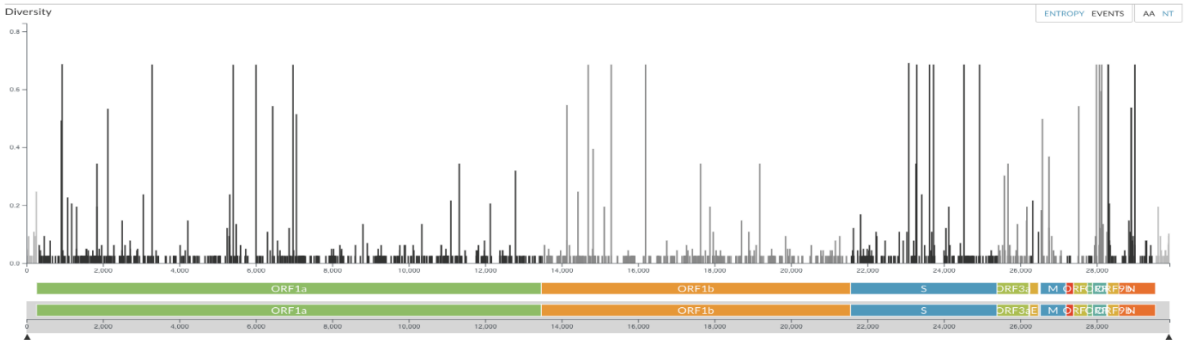
Biến thể AY.57 chiếm ưu thế với 297/328 virus (90,5%), xuất hiện 17/17 tỉnh trong nghiên cứu; 9 biến thể còn lại có số lượng virus từ 1-10 virus, trong đó biến thể B.1.617.2 ghi nhận tại 4 tỉnh, AY.80 ghi nhận tại 2 tỉnh, 7 biến thể còn lại chỉ ghi nhận 1 biến thể tại mỗi tỉnh (Bảng 3.7).

**Bảng 3. 7. Phân bố các biến thể Delta trong nghiên cứu theo tỉnh/thành phố (n=328)**

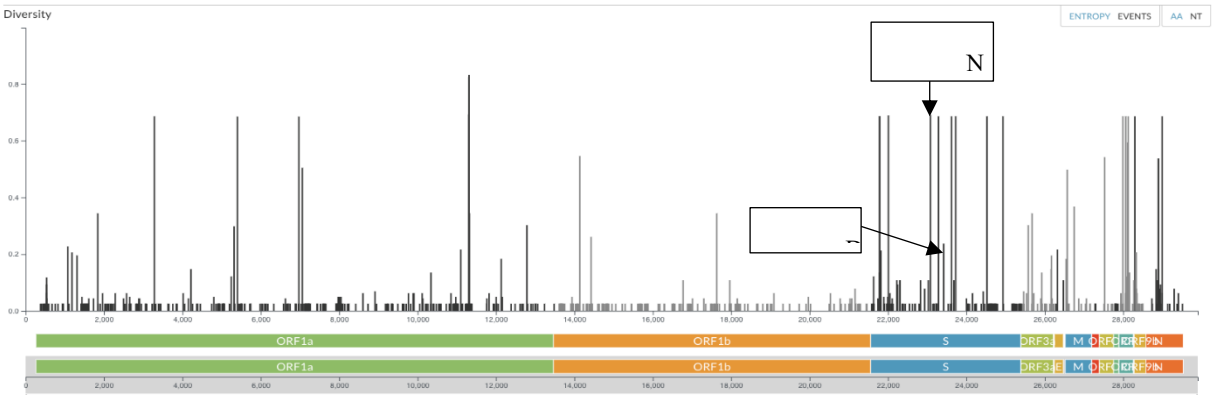
| Phân loại | | Số mẫu | Tỉnh/thành phố |
|---|---|---|---|
| **Pangolin** | **Nextstrain** | | |
| AY.57 | 21I | 297 | Bắc Giang (84), Hà Nội (57), Nghệ An (24), Vĩnh Phúc (19), Hà Tĩnh (18), Sơn La (14), Đà Nẵng (14), Hải Dương (11), Phú Thọ (10), Hà Nam (10), Lạng Sơn (7), Điện Biên (7), Nam Định (6), Quảng Ninh (5), Thái Bình (5), Bắc Ninh (4), Yên Bái (2) |
| B.1.617.2 | 21A, 21I, 21J | 10 | Hà Nội (6), Hà Nam (1), Vĩnh Phúc (1), Yên Bái (2) |
| AY.23 | 21J | 7 | Nam Định |
| AY.80 | 21J | 4 | Hà Nội (1), Vĩnh Phúc (3) |
| AY.85 | 21J | 4 | Điện Biên |
| AY.122 | 21J | 2 | Quảng Ninh |
| AY.54 | 21I | 1 | Yên Bái |
| AY.60 | 21I | 1 | Điện Biên |
| AY.75 | 21I | 1 | Hà Nội |
| AY.79 | 21J | 1 | Hà Nội |

*Sự thay đổi nucleotide và axit amin giữa các biến thể SARS-CoV-2 so với chủng gốc Vũ Hán tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020 - 2021

A




B




**Hình 3. 15. Sự thay đổi về nucleotide (A) và axit amin tương ứng (B) với từng gen của các biến thể SARS-CoV-2 ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020 – 2021**

Phân tích trình tự hệ gen các biến thể SARS-CoV-2 lưu hành cho thấy có sự thay đổi về nucleotide trên toàn bộ hệ gen của virus. Hình 3.15A cho thấy đột biến trên nucleotide xảy ra trên hầu hết các đoạn gen và tạo ra sự đa dạng trong kiểu gen của virus. Sự thay đổi về axit amin (Hình 3.15B) được ghi nhận nhiều nhất trên protein ORF1a, sau đó là protein S và protein N.

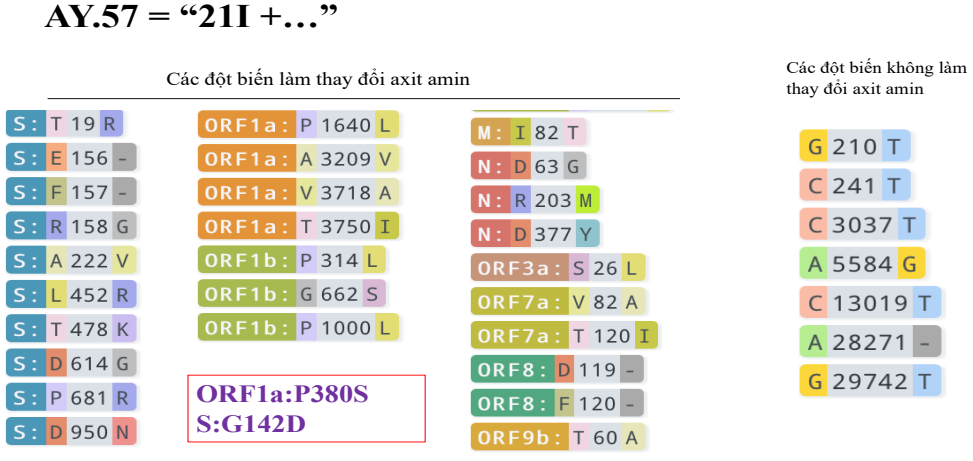
**Bảng 3. 8. Sự thay đổi axit amin trên protein S của các biến thể SARS-CoV-2 so với chủng gốc Vũ Hán , 2020 - 2021**

| Dòng virus (Nextstrain) | Các điểm đột biến trên protein S |
|---|---|
| 19A | T22I, C1250F |
| 19B | E406K |
| 20A | G75R, **D614G** |
| 20B | D80Y, G184S, **D614G**, A672V, Q677H, D808H, I834N, D950N, S1037L, V1122A, Q1208H |
| 20C | D80G, C131W, F133Y, F135Y, C136S, D138K, L141M, F157S, G261A, A264D, **L452R**, **A522E**, G550S, L552K, T553K, E554K, S555*, N556K, **D614G**, T859N, D950H, V963A, E1195A, I1198L, E1202D, A1222D, M1229T, C1235S |
| 20D | **D614G** |
| 20E | L18F, L176F, A222V, **D614G** |
| 20H | L18F, D80A, D215G, L241*, L242*, A243*, **K417N, E484K**, **N501Y**, **D614G**, A701V |
| 20I | H69*, V70*, I105K, F106Y, G107N, D111E, Y144*, D287Y, **E324K, A348S, N501Y**, A570D, **D614G**, P681H, T716I, L878I, G889V, A890E, G891A, I934V, S982A, L1012*, I1013S, A1015D, I1018S, A1020Y, A1026G, T1027S, K1028I, S1030P, D1041E, S1051F, F1052N, Q1054H, H1058T, F1062L, Q1071*, D1118H, Y1209D, P1213Q, I1216S, D1257E, D1260Y, V1264E, H1271K, Y1272K, T1273K |
| 21A | L5F, T19R, L54F, V62G, H66L, K77T, R78I, I101R, I105N, C136P, P139Q, G142D, E156*, F157*, R158G, N188T, P209H, G219S, A222V, L229V, N234D, **L452R**, **T478K, D614G**, **P681R**, D950N |

| | |
|---|---|
| 21I | T19R, R34L, N61K, V62G, T63P, W64R, H66R, A67V, H69N, V70F, G75A, F79I, D80N, F86L, V90D, F92V, T95I, I100K, T109A, S116A, C131R, F133L, G142D, Y144*, K150R, E156*, F157*, R158G, F194L, R214L, A222V, V227L, I233F, A262S, P330L, **L452R**, **T478K**, T573I, T588I, **D614G**, S640F, A647S, S680F, V687I, **P681R,** D950N, T1027I, A1087S, G1124V, V1228L |
| 21J | T19R, V62G, V90D, T95I, D111V, I128H, E132Q, G142D, E156*, F157*, R158G, I233M, **L452R**, **T478K**, **D614G**, **P681R**, M731I, D950N |

* vị trí mất axit amin

Các đột biến trên protein S của virus lưu hành tại miền Bắc và Trung Việt Nam cho thấy có sự tương đồng với các biến thể trên thế giới (Bảng 3.8). Một số đột biến trên protein S mang tính đặc trưng cho biến thể: E406K (19B), L452R và A522E (20C), K417N, E484K, N501Y (20H), E324K, A348S, N501Y (20I), L452R, P681R (21A, 21I, 21J). Các đột biến D614G, N501Y được ghi nhận làm thay đổi bề mặt tiếp xúc của protein S và thụ thể ACE-2 trên tế bào biểu mô đường hô hấp ở người của SARS-CoV-2 trong nghiên cứu tương đồng với các virus lưu hành trên thế giới.




**Hình 3. 16. Các đột biến trên biến thể AY.57**

Biến thể Delta AY.57/21I mang các đột biến đặc trưng của dòng 21I như thay đổi axit amin (9 vị trí), mất axit amin (2 vị trí) đã xảy ra trên protein S, 8 axit amin thay đổi trên protein ORF1ab, 4 vị trí thay đổi axit amin trên protein M, N và 6 sự khác biệt axit amin thuộc protein ORF3a, 7a, 8 và 9b của SARS-CoV-2 lưu hành tại Việt Nam. Ngoài ra, 7 sự thay đổi của nucleotide nhưng không làm thay đổi axit amin cũng đã được ghi nhận. Các đột biến này khi so sánh với các dòng virus khác lưu hành trên thế giới đã xác định được 2 đột biến mang tính đặc trưng riêng là G142D và P380S. Vì vậy, AY.57 đã được Pangolin ghi nhận là một biến thể virus lưu hành đặc trưng tại Việt Nam (Hình 3.16 và bảng 3.8).

# CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

## 4.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ DƯƠNG TÍNH SARS-COV-2 TRONG CÁC MẪU THU THẬP TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP REALTIME RT-PCR, 2020-2021

### *4.1.1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT- PCR, 2020-2021*

Tổng số mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm SARS-CoV-2 từ 28 Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh (CDC) và bệnh viện gửi tới Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (Viện VSDTTƯ) xét nghiệm trong 8 tháng (1/2020-8/2020) là 30.686 mẫu thu thập từ 24.813 ca nghi nhiễm. Trong giai đoạn này, các ca nghi nhiễm được xác định dương tính sẽ tiếp tục được lấy mẫu định kỳ (khoảng 4 ngày/lần) đến khi khẳng định âm tính mới kết luận khỏi bệnh COVID-19. Chiến lược phòng chống dịch của Việt Nam duy trì các biện pháp: dự phòng, phát hiện sớm bằng xét nghiệm, cách ly, phong toả hẹp tại các khu vực ảnh hưởng, kiểm soát nhập cảnh và điều trị hiệu quả. Tại thời điểm đó, phương pháp Realtime RT-PCR là tiêu chuẩn "vàng" để chẩn đoán nhiễm SARS-CoV-2 và Viện VSDTTƯ là đơn vị được Bộ Y tế cho phép công bố kết quả khẳng định dương tính. Chính vì vậy, số mẫu được gửi từ các đơn vị khác đến Viện để xét nghiệm và khẳng đinh kết quả xét nghiệm là rất lớn.

Tổng số 251 (1,0%) trường hợp được phát hiện dương tính bằng phương pháp Realtime RT-PCR, trong đó phần lớn từ các trường hợp nhập cảnh 195/251 (77,7%). Tỷ lệ dương tính với SARS-CoV-2 phát hiện ở Việt Nam tương tự các nước Tây Thái Bình Dương, Hàn Quốc 1,0%, cao hơn New Zealand 0,18% trong cùng thời điểm [138]. Tỷ lệ dương tính thấp hơn tỷ lệ công bố của TCYTTG tại châu Âu 19%, Đông Nam Á 21% và châu Mỹ là 48% [7, 91, 104]. Chính sách kiểm soát dịch bệnh của các nước châu Âu như Anh,

Pháp, Tây Ban Nha hay Mỹ…là tạo "miễn dịch cộng đồng" với 2/3 dân số nhiễm virus và sản sinh kháng thể, hoặc nghiên cứu, sản xuất được vắc xin với khả năng phân phối rộng rãi. Các trường hợp SARS-CoV-2 được xác nhận tại tại Việt Nam phần lớn là các trường hợp nhập cảnh từ bên ngoài, từ Trung Quốc, Châu Âu, Anh, Nga, Mỹ và một số quốc gia châu Á khác, nơi SARS-CoV-2 lưu hành với tỷ lệ lưu hành cao. Tỷ lệ nhiễm COVID-19 thấp trong cộng đồng ở miền Bắc, miền Trung cũng như Việt Nam nói chung thể hiện chiến lược phòng chống COVID-19 có hiệu quả tại thời điểm chưa có biện pháp dự phòng hữu hiệu bằng vắc xin và thuốc kháng virus đặc hiệu, cũng như vị trí địa lý cạnh Trung Quốc là nơi đang bùng phát dịch mạnh.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng ghi nhận số trường hợp nhiễm tại cộng đồng thấp tại Sơn Lôi, Mê Linh, Hà Nội; tất cả các trường hợp trên đều có yếu tố dịch tễ liên quan, vì vậy dễ dàng kiểm soát được các ca bệnh.

Tại giai đoạn đầu của đại dịch, xét nghiệm là một phần chiến lược quan trọng để kiểm soát sự lây truyền của dịch bệnh, trì hoãn sự lây truyền để có một khoảng thời gian cần thiết phát triển vắc xin và thuốc điều trị đặc hiệu. Phần lớn các nước bị ảnh hưởng của dịch bệnh đều thực hiện chiến lược xét nghiệm diện rộng. Tuy nhiên, tỉ lệ phát hiện mẫu dương tính trong nghiên cứu của chúng tôi là 1,0% trên tổng số 24.813 ca nghi nhiễm đã cho thấy cần có sự điều chỉnh chiến lược xét nghiệm để đảm bảo khả năng cung cấp sinh phẩm, giảm gánh nặng kinh tế cũng như giảm áp lực làm việc cho nhân viên y tế. Thực tế, chiến lược xét nghiệm cũng đã thay đổi tại các giai đoạn sau khi số lượng mẫu ngày càng lớn như: xét nghiệm mẫu gộp, sử dụng test nhanh phát hiện kháng nguyên, phối hợp xét nghiệm Realtime RT-PCR và test nhanh kháng nguyên. Sự thay đổi này phụ thuộc vào khả năng đáp ứng của hệ thống y tế cũng như đặc điểm của virus gây dịch.

Từ tháng 9/2020, khi các Trung tâm kiểm soát bệnh tật (CDC) và bệnh viện các tỉnh/thành phố được tập huấn xét nghiệm chẩn đoán SARS-CoV-2, được đánh giá đủ năng lực xét nghiệm, khi đó Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương chỉ tiếp nhận các ca khẳng định để tiến hành nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm hệ gen cũng như hỗ trợ các CDC truy vết nguồn gốc của các ổ dịch. Những mẫu dương tính sau đó được sàng lọc thông qua tải lượng virus cao với giá trị Ct gen E < 30. Trong giai đoạn này, 656 mẫu dương tính SARS-CoV-2 được gửi đến phòng thí nghiệm. Tính cả 2 giai đoạn từ tháng 01/2020 đến 08/2020 và giai đoạn tháng 9/2020 đến 12/2021, số mẫu dương tính khẳng định là 907 mẫu trong đó nhóm tuổi >18-49 chiếm số lượng ca nhiễm, cao nhất so với các nhóm tuổi khác 575/907 (63,4%), phản ánh mức độ tiếp xúc và khả năng lây lan trong lứa tuổi này có thể cao hơn do hoạt động xã hội, làm việc và các yếu tố khác so với các nhóm tuổi khác (Hình 3.6).

Chiến lược xét nghiệm cũng được điều chỉnh phù hợp với từng thời điểm, trong đó trong giai đoạn dịch đầu tiên từ tháng 1/2020-tháng 8/2020 thực hiện xét nghiệm Realtime RT-PCR trên diện rộng và áp dụng xét nghiệm từng mẫu đơn lẻ nên sinh phẩm chẩn đoán và khối lượng công việc xét nghiệm tại Viện VSDTTƯ là rất lớn. Làn sóng dịch thứ 2 tại Đà Nẵng, với số lượng ca nhiễm tăng, phải áp dụng giãn cách xã hội, bắt đầu xuất hiện những ca tử vong đầu tiên thì chiến lược xét nghiệm gộp mẫu đã được áp dụng để rút ngắn hơn nữa thời gian có kết quả xét nghiệm. Mở rộng và phân cấp xét nghiệm là những chính sách trong chiến lược của Việt Nam nhằm giảm thiểu nguy cơ xâm nhập và lây lan của SARS-CoV-2.

### *4.1.2. Tải lượng RNA SARS-CoV-2 và mối tương quan giữa tải lượng virus và giá trị Ct, 1/2020-8/2020*

Giá trị Ct của các mẫu SARS-CoV-2, không có sự khác biệt giữa nhóm nhập cảnh và nhóm cộng đồng có giá trị Ct < 30. Giá trị Ct trong các mẫu bệnh

phẩm lâm sàng trong nghiên cứu tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam tương tự như các nghiên cứu ở châu Âu [10, 18, 116, 124]. Phần lớn các mẫu đều có giá trị Ct <30, điều này cho thấy khả năng lây nhiễm cao của SARS-CoV-2 [69, 71, 109]. Trong theo dõi, cách ly, xét nghiệm các bệnh nhân nhiễm SARS-CoV-2, lấy mẫu liên tiếp trong khoảng thời gian cách ly, khoảng cách trung bình giữa các lần lấy mẫu là 4 ngày, hơn 50% mẫu thứ hai và 25% từ mẫu thứ ba vẫn dương tính cho thấy virus tồn tại kéo dài.

Việc phát hiện RNA của virus trong thời gian dài trong các mẫu từ bệnh nhân đã khỏi bệnh COVID-19 là một mối lo ngại, vì phần lớn các mẫu này có giá trị Ct cao. Tuy nhiên, những mẫu này không có khả năng nhân lên trên tế bào cảm thụ (Ct >30) [47, 60]. Kết quả cho thấy rằng những trường hợp này không có khả năng lây truyền bệnh. Những phát hiện này phù hợp với những nghiên cứu tại Trung Quốc và Hàn Quốc [58, 59, 97] và ủng hộ giả thuyết rằng sự phát tán kéo dài hoặc tái dương tính của các mẫu không liên quan đến việc tiếp tục nhân lên của virus. Điều này mang lại sự yên tâm cho những bệnh nhân có kết quả Realtime RT-PCR dương tính với giá trị Ct >30 trong hơn 10 ngày sau khi khởi phát hoặc có kết quả dương tính đầu tiên và sau khi có kết quả âm tính sẽ có nguy cơ lây truyền rất thấp. Những phát hiện này cũng hỗ trợ chiến lược xét nghiệm dựa trên các dấu hiệu phục hồi lâm sàng.

Trong thời gian nghiên cứu (8 tháng), số trường hợp nhiễm COVID-19 từ nguồn nhập cảnh chiếm 2/3 tổng số trường hợp mắc COVID-19 (195/251 trường hợp, bảng 3.1). Vì vậy khả năng lây lan của virus đang rất được quan tâm. Tải lượng virus được tiến hành như một công cụ để dự đoán độc lực của virus. Sau hai tháng dịch COVID-19 bùng phát tại Việt Nam, ca bệnh đầu tiên trong cộng đồng xuất hiện sau ca bệnh nhập cảnh từ Trung Quốc [98].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phân loại tải lượng virus thông qua số bản copy RNA/ul xác định trên mẫu xét nghiệm (Hình 3.3), và chia thành 3

mức độ: tải lượng cao, trung bình, và thấp tương đương với giá trị Ct <22 (cao); 22<= Ct<32 (trung bình ) và Ct>32 (thấp). Việc phân loại mẫu theo tải lượng virus cho phép dự báo khả năng thành công khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo bằng phương pháp giải trình tự gen, phân lập virus.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tải lượng virus cao được phát hiện tại nhóm nhập cảnh vào Việt Nam tháng 3, tháng 5 và tháng 8/2020, tương đồng với tình hình dịch lưu hành trên thế giới cùng thời điểm với sự nổi trội của SARS-CoV-2 dòng 20B và 20A với sự xuất hiện đột biến D614G trên protein S tăng khả năng lây nhiễm so với SARS-CoV-2 giai đoạn trước đó dòng 19B (Hình 3.4 và 3.11). Kết quả trên cũng gợi ý tải lượng virus trên mẫu lâm sàng phụ thuộc không chỉ thời điểm lấy mẫu, kỹ thuật lấy mẫu mà còn phụ thuộc vào đặc tính SARS-CoV-2 và đó cũng là một trong những yếu tố để Tổ chức YTTG phân loại SARS-CoV-2 thành các biến thể đáng quan tâm (VOI), biến thể đáng quan ngại (VOC).

Phân tích tương tự tại các trường hợp dương tính với SARS-CoV-2 xảy ra tại các cộng đồng cho thấy giá trị Ct thấp được ghi nhận chủ yếu tại mẫu thu thập vào tháng 2 tại ổ dịch Sơn Lôi -Vĩnh Phúc liên quan đến SARS-CoV-2 dòng 19B (Hình 3.4). Kết quả trên bổ sung thêm nhận định tải lượng virus trong mẫu bệnh phẩm phụ thuộc vào đặc tính virus và chiến lược xét nghiệm phát triển cần điều chỉnh phù hợp với đặc tính virus tại từng thời điểm gây dịch.

Trong giai đoạn 2 là hệ quả của vụ dịch tại Đà Nẵng, cảnh báo về sự gia tăng lây nhiễm virus trong cộng đồng. Bộ Y tế khi đó đã có hành động hiệu quả nhằm giảm sự lây truyền trong cộng đồng để Việt Nam công bố ca nhiễm trong cộng đồng kể từ tháng 8 năm 2020 [59]. Báo cáo của Bộ Y tế cho thấy hơn 65% bệnh nhân mắc COVID-19 không có triệu chứng nên việc xác định tải lượng virus có thể dự đoán được độc lực của SARS-CoV-2 là hết sức cần thiết.

### *4.1.3. Phân lập SARS-CoV-2*

SARS-CoV-2 thích ứng tốt trên tế bào Vero-E6 cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu về phân lập virus tại các nước trên thế giới như Trung Quốc, Singapore… SARS-CoV-2 gắn bám thụ thể ACE-2 (Angiotensin Converting Enzym 2) trên bề mặt tế bào biểu mô đường hô hấp trên người để xâm nhập và nhân lên [87].

Mặc dù nuôi cấy virus là tiêu chuẩn vàng để xác nhận nhiễm virus, nhưng Realtime RT-PCR là tiêu chuẩn vàng được chấp nhận để phát hiện SARS-CoV-2 nhằm mục đích xác định và truy vết người tiếp xúc vì thời gian cho kết quả nhanh hơn, độ nhạy cao hơn. Việc định lượng RNA của virus từ giá trị Ct có thể được sử dụng để chọn mẫu trong phân lập virus [107, 109, 111, 112] để đảm bảo sự thành công của phương pháp phân lập, khi phải thực hiện trong điều kiện an toàn sinh học cấp 3.

Chúng tôi quan sát thấy mối tương quan chặt chẽ giữa giá trị Ct và tỷ lệ dương tính trong nuôi cấy tế bào, cho thấy rằng tải lượng virus có thể được sử dụng làm một tiêu chí xác định khả năng lây nhiễm của bệnh nhân bị nhiễm bệnh (Bảng 3.3).

Kết quả bảng 3.3 cũng ghi nhận có 20/29 (68,9%) mẫu bệnh phẩm gây nhiễm có xuất hiện CPE trên tế bào cảm nhiễm trong vòng 72-96 giờ, thời gian xuất hiện hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE) tương tự với thời gian ủ bệnh trên lâm sàng. Kết quả trên phù hợp với các báo cáo tại Trung Quốc trên những bệnh nhân nhiễm SARS-CoV-2 năm 2019 có thời gian ủ bệnh từ 4-6 ngày [77]. Sử dụng kết quả phân lập virus với các thông tin về thời gian xuất hiện CPE cho phép xác định chu kỳ lây nhiễm của virus để điều chỉnh chiến lược xét nghiệm cũng như cách ly trong công tác phòng chống dịch bệnh tại cộng đồng.

## 4.2. ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM, 2020-2021

Giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS) là một công nghệ mới được áp dụng tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương từ năm 2017, đây là phương pháp cho phép thu được toàn bộ trình tự của hệ gen trong một lần thực hiện, tuy nhiên để có kết quả giải trình tự gen theo công nghệ NGS thành công phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là chất lượng mẫu. Nghiên cứu đã lựa chọn các mẫu có tải lượng virus cao (Ct<30) để thực hiện, tỉ lệ thành công (thu được toàn bộ trình tự gen SARS-CoV-2) là 92.2% (549/595 mẫu) (Bảng 3.4). Kết quả trên cho thấy tuy đây là công nghệ mới thực hiện trên tác nhân mới là SARS-CoV-2, nhưng quy trình kỹ thuật được đánh giá và áp dụng phù hợp, cùng với kỹ thuật thực hành đã đáp ứng tốt mục tiêu nghiên cứu.

Trong giai đoạn 2020-2021, Việt Nam ghi nhận 4 làn sóng dịch, với các tác nhân chủ yếu gây dịch là các dòng SARS-CoV-2 khác nhau bao gồm cả các biến thể đáng quan tâm (VOI) hoặc biến thể đáng quan ngại (VOC). Nghiên cứu có đủ đại diện các dòng virus trong 4 làn sóng dịch tại Việt Nam. Bên cạnh đó, trong giai đoạn đầu của dịch, Việt Nam thực hiện rất chặt chẽ biện pháp kiểm dịch tại cửa khẩu, vì vậy trong nghiên cứu có 65 mẫu thu thập từ những người nhập cảnh tại các nước khác và thực hiện cách ly tại các trung tâm cách ly tập trung ở Việt Nam (Bảng 3.5). Sự đa dạng về mẫu tại 4 làn sóng dịch khác nhau tại Việt Nam cũng như các mẫu có nguồn từ các nước khác nhau cho kết quả nghiên cứu có thêm thông tin tham khảo về các dòng virus lưu hành trên thế giới cũng như sự khác nhau giữa các dòng virus gây dịch tại Việt Nam (Hình 3.10).

Sự đa dạng hệ gen của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam đã được xác định trong giai đoạn 2020-2021. Sự đa dạng này được xác định xảy ra trong cả nhóm nhập cảnh và nhóm cộng đồng trong nước, tổng số

12 dòng (clade) SARS-CoV-2 (theo phân loại Nextstrain) tương đương với 42 loại virus (theo phân loại Pangolin) được ghi nhận trong nghiên cứu tại cả 2 nhóm mẫu thu thập tại cộng đồng và khu cách ly người nhập cảnh (Bảng 3.5). Trong đó có 03 biến thể đã được phát hiện đó là Alpha (20I/501Y.V1- B.1.1.7); Beta ( 20H/501Y.V2- B.1.1.351) và Delta với các dòng 21A (B.1.617.2); 21I (AY.54; AY.57; AY.60; AY.75; AY.80; B.1.617.2) và 21J (AY.23; AY.79; AY.85; AY.122, B.1.617.2) (Bảng 3.5).

Theo dõi thời điểm xuất hiện biến thể, chúng tôi nhận thấy các biến thể SARS-CoV-2 trong cộng đồng trong nước xuất hiện cùng lúc hoặc sau các biến thể ở nhóm nhập cảnh. Dòng 20B và 20I vẫn tồn tại trong cộng đồng và sau đó lan rộng khắp Việt Nam lần lượt vào tháng 3 - 8/2020 và tháng 1 - 4/2021. Nhóm nhập cảnh có thể đã nhiễm virus từ nhiều nguồn khác nhau, tại các khu vực khác nhau trên thế giới. Nhóm cộng đồng tuy các biến thể xuất hiện muộn hơn nhưng thời gian tồn lưu trong cộng đồng lâu hơn. Kết quả này cho thấy việc tăng cường giám sát virus trong cộng đồng là việc hết sức cần thiết. Việc giám sát này không những cho phép các nhà quản lý có thể biết được chính xác các chủng SARS-CoV-2 lưu hành trong cộng đồng mà còn có thể áp dụng các biện pháp phòng bệnh kịp thời trong trường hợp biến thể xuất hiện có dấu hiệu gây tăng nặng trên lâm sàng.

Phân tích sự phân bố của SARS-CoV-2 theo địa điểm, trong làn sóng dịch COVID-19 thứ nhất và thứ hai tại Việt Nam cho thấy dòng 20B được phát hiện tại nhiều tỉnh thành với số lượng lớn tại Đà Nẵng, Hải Dương, là những nơi bùng phát dịch mạnh trong cộng đồng. Trong thời gian này (từ 23/01 đến 24/07/2020; từ 25/07/2020 đến 27/01/2021), có nhiều ca nhiễm COVID-19 đến Việt Nam từ Anh và các nước Châu Âu. Do vậy, việc phát hiện dòng 20B trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với cập nhật vào tháng 5/2020 khi dòng 20B chiếm ưu thế ở Anh, Mỹ, Nhật, các nước Châu Âu và một số quốc gia Nam

Mỹ. Làn sóng dịch thứ 3 (28/01/2021 - 26/04/2021) tại Việt Nam được gây ra chủ yếu bởi biến thể 20I, khác với làn sóng dich thứ 2 có nhiều biến thế cùng song hành tồn tại (Bảng 3.6). Tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, các tỉnh/thành phố gửi mẫu thực hiện giải trình tự gen gồm Đà Nẵng, Hà Nội, Hải Dương, Hà Nam, Hà Tĩnh, Hải Phòng. Đây là các tỉnh/thành phố có số lượng bệnh nhân COVID-19 đông tại thời điểm này. Theo dõi sự xuất hiện của virus dòng 20B, Pangolin đã ghi nhận sự xuất hiện của virus từ tháng 7/2020 tại Anh, sau đó lan tới Mỹ, các nước châu Âu và châu Á, đạt đỉnh vào tháng 11/2020.

Phân tích về các đột biến phát hiện trong nghiên cứu cho thấy, dòng 20B đã được ghi nhận mang một số đột biến có thể làm tăng khả năng lây lan trong cộng đồng được tìm thấy ở nhiều tỉnh thành của Việt Nam. Dòng này lây lan nhanh hơn các dòng 19A, 19B hay 20A, tương tự với báo cáo của các nước trên thế giới và trong khu vực. Nghiên cứu cũng xác định một số đột biến quan trọng trên protein S là D614G, và đột biến trên protein N là R203K, G204R của dòng 20B tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam đã được ghi nhận giống với dòng 20B đang lưu hành trên thế giới tại thời điểm đó [118]. Tương tự, số lượng đột biến trên protein S của dòng 20A được ghi nhận gồm hai đột biến G75R, D614G. Trong đó D614G được coi là đột biến quan trọng đặc trưng cho dòng 20A giúp protein S ổn định hơn, gắn chặt vào ACE-2 làm tăng khả năng lan truyền virus trong quần thể. Dòng 20B, số lượng đột biến axit amin trên protein S (11 axit amin) tăng gấp 5 lần so với dòng 20A và vẫn bao gồm D614G (Bảng 3.8). Các đột biến trên đã thể hiện trên cây phát sinh chủng loại của dòng 20B đã tách thành một nhóm riêng biệt, khác với dòng 19A và 19B lưu hành trước đó (Hình 3.12). Trong vòng 4 tháng, từ tháng 1 – 4/2020, SARS-CoV-2 đã thay đổi trên hệ gen tạo ra các biến thể có khả năng thích nghi với biểu mô đường hô hấp của người tốt hơn, lây lan nhanh hơn trong quần thể. Đây cũng là nguyên

nhân chính của hai vụ dịch trong cộng đồng tại Hải Dương và Đà Nẵng năm 2020.

Với dòng 20B, số ca mắc COVID-19 tăng nhanh, và dòng 20B/B.1.1 tại Đà Nẵng là những ca tử vong đầu tiên tại Việt Nam. Theo các báo cáo từ Bộ Y tế, các trường hợp tử vong đều có liên quan đến tình trạng bệnh nền (ung thư, tiểu đường, tim mạch…). Như vậy, nhiễm SARS-CoV-2 có thể gây các biến chứng cho bệnh nhân COVID-19 khi đã mắc các bệnh mạn tính.

***Biến thể Alpha/20I/B.1.1.7 và Beta/B.1.315***

Vào cuối tháng 1/2021, có 2 đợt bùng phát dịch lớn tại tỉnh Hải Dương và Quảng Ninh khởi phát làn sóng dịch COVID-19 thứ 3 tại Việt Nam. Kết quả giải trình tự gen cho thấy dòng 20I/B.1.1.7 xuất hiện thay thế dòng 20B trước đó và được TCYTTG báo cáo là một biến thể đáng lo ngại của SARS-CoV-2, đặt tên là Alpha. Cây phát sinh chủng loại của các biến thể SARS-CoV-2 ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam cho thấy sự khác biệt lớn của biến thể Alpha so với các virus trước đó. Có nguồn gốc di truyền từ dòng 20B, tuy nhiên với số lượng axit amin đột biến trên protein S là 40 axit amin, biến thể Alpha đã tách nhánh để tạo thành một nhánh riêng biệt (Hình 3.11). Theo dõi sự tiến hoá của virus , các nhà khoa học đã nhận thấy có sự đột biến nucleotide trên gen S với số lượng nhiều hơn các gen khác, nhưng biểu hiện kiểu hình (thay đổi axit amin) trên khoảng 40 vị trí. Trong các vị trí đột biến, sự thay đổi trên protein S tại vị trí N501Y đã làm thay đổi miền liên kết của protein S với thụ thể ACE-2 trên tế bào biểu mô đường hô hấp, dẫn đến khả năng lây truyền cao hơn so với các virus ban đầu. Do đó, biến thể Alpha trở thành biến thể chủ đạo của SARS-CoV-2 không chỉ ở Việt Nam mà còn ở các nước khác trên thế giới trong khoảng thời gian từ tháng 1-3/2021 [132]. Ngoài biến thể Alpha (dòng 20I), làn sóng dịch thứ 3 còn ghi nhận sự xuất hiện của biến thể Beta (dòng 20H/B.1.351). Đây là biến thể xuất hiện 5/6 ca bệnh có nguồn gốc từ Nam Phi

và 1 ca bệnh trong cộng đồng tại Việt Nam. Hai dòng 20H, 20I được báo cáo có sự thay đổi trên protein S tại vị trí tương tác với thụ thể ACE-2. Tuy nhiên, dòng 20H còn mang các đột biến mất axit amin tại vị trí 242-244 nghi ngờ liên quan đến khả năng trốn tránh miễn dịch, làm giảm khả năng bảo vệ của vắc xin phòng COVID-19.

Khi so sánh trình tự gen và xây dựng cây phát sinh chủng loại, SARS-CoV-2 lưu hành tại Việt Nam đã có sự phân nhóm có liên quan đến một số ổ dịch do biến thể Alpha ở các tỉnh Hải Dương, Quảng Ninh, Hà Nam và Đà Nẵng (Hình 3.12). Ổ dịch ở tỉnh Hải Dương phát triển thành ổ dịch lớn ở khu công nghiệp. Sau 3 tháng, ổ dịch mới ở Đà Nẵng được hình thành, gây ra làn sóng COVID-19 ở miền Trung Việt Nam. Từ những kết quả phân tích này có thể hiểu rõ hơn về nguồn gốc, đặc điểm của SARS-CoV-2 gây ra các vụ dịch tại các tỉnh, mặc dù vẫn là biến thể Alpha nhưng với mỗi nhóm (cluster) lại có những đặc điểm khác nhau (nucleotide) và có thể phân biệt thông qua giải trình tự gen. Nghiên cứu trên các virus lưu hành tại Đà Nẵng được thực hiện để hiểu sâu hơn về tình huống này cho thấy có những đột biến nucleotide đặc trưng cho các bệnh nhân COVID-19 có nguồn gốc từ bệnh viện, các ca nhiễm cộng đồng (Hình 3.12).

Hệ gen của biến thể Alpha với hơn 40 đột biến axit amin, được báo cáo là một biến thể đáng lo ngại. Vì vậy, việc giám sát thường xuyên và chủ động hệ gen SARS-CoV-2 là một việc cần thiết trong phòng thí nghiệm.

***Biến thể Delta/21A,21I, 21J***

Biến thể Delta (B.1.617) được phát hiện đầu tiên tại Ấn Độ (tháng 10/2020), sau đó lan ra các nước trong khu vực và trên thế giới (tháng 12/2020), trở thành biến thể giám sát (Variant under Monitoring – VUMs) và biến thể quan tâm (Variant of Concern - VOIs), lưu hành mang các đột biến tạo ưu thế cho sự lây truyền trong quần thể là các đột biến D614G, L452R, P681R, và

T478K, K417N trên protein S [54]. Đặc biệt, đột biến L452R tại vị trí axit amin 452 khi thay thế arginine bằng leucine dẫn đến protein S gắn kết với thụ thể ACE2 bền chặt hơn so với các biến thể Alpha, Beta. Đột biến L452R có thể ngăn chặn tế bào T-CD8 tiêu diệt và loại bỏ virus [111]. Vì vậy, đột biến L452R là đột biến đáng quan tâm và đã được đưa vào để lựa chọn sản xuất vắc xin từ khi xuất hiện biến thể Delta [63]. Một đột biến quan trọng khác đó là đột biến P681R với sự thay thế arginine bằng proline ở vị trí axit amin 681 dẫn đến gia tăng khả năng phân tách của protein S thành 2 phần S1 và S2 giúp cho khả năng gắn kết của virus vào tế bào chủ tốt hơn [13]. Điều đó dẫn đến biến thể Delta lây lan với tốc độ gấp đôi so với biến thể Alpha. Biến thể Delta được chứng minh là tăng nguy cơ nhập viện cao hơn 108%, nhập viện trong tình trạng nặng (ICU) cao hơn 235% và nguy cơ tử vong cao hơn 133% so với biến thể gốc Vũ Hán [120]. Chính vì vậy, tại Việt Nam, tính đến tháng 9/2021 số ca tử vong tăng mạnh lên đến hơn 15.000 người [79].

Một nghiên cứu tại Anh chỉ ra rằng những người tiêm vắc xin có hiệu quả bảo vệ trước biến thể Delta giống như biến thể Alpha. Một liều duy nhất của BNT162b2 (Pfizer) hoặc ChAdOx1 nCoV-19 (Astra Zeneca) có hiệu quả giống nhau đối với biến thể Delta so với 48,7% đối với biến thể Alpha. Hai liều BNT162b2 có hiệu quả tới 93,7% với biến thể Alpha và 88% với biến thể Delta. Hai liều ChAdOx1 nCoV-19 hiệu quả 74,5% đối với Alpha và 67% đối với Delta [75]. Hiệu quả của vắc xin mRNA-1273 (Moderna) cho thấy một liều, hai liều và ba liều vắc xin có hiệu quả bảo vệ lần lượt là 55,6%; 60,7% và 94% [63].

Từ cuối tháng 4/2021-12/2021, nghiên cứu đã thực hiện giải trình tự gen với số lượng lớn 328 virus (Bảng 3.5), các mẫu này thu thập tại các đợt bùng phát dịch trong cộng đồng Việt Nam. Với đặc tính của biến thể Delta là có tải lượng virus cao (Ct<30) nên kết quả thành công thu được trong giải trình tự toàn bộ hệ gen của virus cũng cao.

Trong nghiên cứu, biến thể Delta được xác nhận bắt đầu lưu hành tại Việt Nam với 10 biến thể, trong đó chủ yếu là AY.57 (90,5%) tiếp theo đó là biến thể B.1.617.2 (3,1%), AY.23(2,1%), AY.80 (1,2%), AY.85 (1,2%)…Mặc dù các nghiên cứu trên thế giới có ghi nhận dòng phổ biến của nhóm này là B.1.617.2; tại Việt Nam, trong giai đoạn đầu lưu hành biến thể Delta có ghi nhận dòng lưu hành chủ yếu là B.1.617.2 do phát hiện các ca nhiễm đầu tiên của đoàn chuyên gia Ấn Độ và Trung Quốc cách ly ở Yên Bái. Sau thời gian cách ly, đoàn chuyên gia đã di chuyển đến các tỉnh Vĩnh Phúc, Đà Nẵng, Hà Nội, Bắc Giang…khi trong đoàn đã có người mắc COVID-19, từ đây dịch bắt đầu lây lan ở Đà Nẵng, Hà Nội, Vĩnh Phúc. Trong giai đoạn này, biến thể AY.57 lưu hành phổ biến trên khắp các tỉnh/thành phố và đã gây ra các đợt bùng phát lớn ở Bắc Giang và Hà Nội.

Thực hiện chính sách kiểm soát nghiêm ngặt được áp dụng trong làn sóng dịch thứ 4 tại Việt Nam với việc hạn chế di chuyển nội địa cùng với việc kiểm soát biên giới chặt chẽ có thể là yếu tố quyết định làm cho biến thể AY.57 tập trung chủ yếu ở Việt Nam và giới hạn ở các tỉnh/ thành phố. Các virus lưu hành tại Việt Nam mang đầy đủ các đột biến quan trọng của biến thể Delta là D614G, L452R, P681R, T478K và có thêm các đột biến đặc trưng D142G trên protein S, P380S trên ORF1a, cùng với các đột biến khác trên protein M, ORF3a, ORF 7a, ORF 8, ORF 9b tạo nên biến thể AY.57.

Nghiên cứu xác định sự tiến hoá của biến thể Delta (B.1.617.2) thể hiện sự phân tách thành 3 dòng 21A; 21I và 21J tương đương với 9 biến thể (AY.54; AY.57; AY.60; AY.75; AY.80; AY.23; AY.79; AY.85; AY.122) lưu hành tại Việt Nam, trong đó biến thể AY.57 được xác định là biến thể đặc trưng cho Việt Nam. Biến thể AY.57 được GISAID ghi nhận lần đầu tiên phát hiện tại Việt Nam (tháng 4/2021) và sau đó được ghi nhận tại các nước khác trên thế giới [84, 112]. Sự đa dạng di truyền của biến thể Delta cũng được thể hiện khi

phân tích cây phát sinh chủng loại cho thấy có sự phân nhóm rõ ràng theo tỉnh/thành phố, tuy nhiên vẫn có sự giao thoa của các biến thể trong các địa phương xảy ra dịch. Sự xuất hiện các dòng cũng như sự tiến hoá phân tách dòng của biến thể Delta phản ánh quy mô dịch SARS-CoV-2 tại Việt Nam trong thời giai đoạn tháng 5-12/2021. Đó là một làn sóng dịch lớn nhất với số nhiễm lớn 1.727.398 và số tử vong 32.359 [112], dịch xuất hiện trên toàn quốc và gây hậu quả nặng nề tại khu vực phía Nam, đặc biệt tại thành phố Hồ Chí Minh.

**Bảng 4. 1. Nguồn gốc các biến thể Delta lưu hành tại Việt Nam [86, 112]**

| **Biến thể** | **Nơi xuất hiện đầu tiên** | **Tỷ lệ lưu hành theo quốc gia, 2021** |
|---|---|---|
| B.1.617.2 | B.1.617 Indian lineage | Ấn Độ 79%, UK 5%, USA 3% |
| AY.23 | B.1.617.2.23, Singapore, Indonesia lineage | Indonesia 31%, Singapore 28%, Malaysia 14% |
| AY.54 | B.1.617.2.54, USA lineage | USA 97%, Ấn Độ 1%, Canada 1% |
| AY.57 | B.1.617.2.57 Viet Nam lineage | Việt Nam 83%, USA 4%, Germany 4%, |
| AY.60 | B.1.617.2.60, European lineage | Đan Mạch 27%, Thuỵ Sỹ 18%, Đức 9% |
| AY.75 | B.1.617.2.75, USA, European lineage | USA 81%, Thuỵ Điển 8%, Ấn Độ 2%, Pháp 1%, Đức 1% |
| AY.79 | B.1.617.2.79, Malaysia lineage | Malaysia 59%, USA 11%, Indonesia 10%, Thái Lan 7%, Singapore 4% |
| AY.80 | B.1.617.2.80, European lineage | Đan Mạch 80%, Đức 4%, USA 3% |
| AY.85 | B.1.617.2.85, Thailand lineage | Thái Lan 83%, Cambodia 7%, Thuỵ Điển 2%, USA 2% |
| AY.122 | B.1.617.2.122, European lineage | Đức 18%, USA 14%, Đan Mạch 11%, Pháp 7% |

Mỗi biến thể đã phát triển thành một nhánh riêng: AY.23, AY.79 là nhánh virus lưu hành chính tại Singapore và Indonesia; AY.54 lưu hành chính tại Mỹ; AY.57 là nhánh virus lưu hành chính tại Việt Nam; AY.60, AY.75, AY .80, AY.122 là các biến thể virus lưu hành chính tại Châu Âu; AY.85 lưu hành chủ yếu tại Thái Lan (Bảng 4.1). Từ các thông tin này, có thể xác định được nguồn gốc của các biến thể lưu hành tại Việt Nam, đồng thời có thể so sánh được sự khác biệt giữa các virus lưu hành.

Sự đa dạng của biến thể Delta dựa trên phân tích trình tự gen thu được trong nghiên cứu cũng như các trình tự gen tham khảo từ ngân hàng gen (GISAID) và các công cụ phân tích trực tuyến (Pangolin, Nextclade). Chính với sự đa dạng trong trình tự gen thông quan sự thay đổi nucleotide, axit amin mà virus có khả năng tránh được hệ thống miễn dịch của vật chủ, có thể dẫn đến giảm hiệu quả của việc sử dụng vắc xin. Hơn nữa, tỉ lệ tử vong do virus Delta gây ra cao gấp 2 lần so với các biến thể lưu hành trước đó [64]. Do vậy, việc giám sát sự thay đổi của virus trong quần thể nhằm tìm hiểu về những tác động do virus gây ra và lựa chọn các virus cập nhật để sản xuất vắc xin là rất cần thiết.

Moderna là một trong những công ty điển hình luôn cập nhật và phát triển vắc xin thích ứng với sự thay đổi liên tục của SARS-CoV-2, để duy trì mức độ miễn dịch và hiệu giá kháng thể trung hoà. Sau phiên bản vắc xin đầu tiên mRNA-1273, tháng 2/2021 Moderna đã công bố chiến lược cập nhật các virus vắc xin, bao gồm cả các vắc xin đơn giá (monovalent) và vắc xin nhị giá (bivalent) phù hợp với nhiều biến thể quan tâm của SARS-CoV-2. Đến nay, Moderna đã phát triển 6 phiên bản vắc xin cập nhật như vắc xin mRNA-1273.211 với 9 đột biến tại protein S của biến thể Beta, vắc xin mRNA-1273.214 với 32 đột biến tại protein S của biến thể Omicron. Các loại vắc xin cập nhật này sẽ được tiêm như liều tăng cường (booster), được chứng minh có

hiệu giá trung hoà vượt trội so với vắc xin mRNA-1273, duy trì kháng thể trong 6 tháng sau khi tiêm với các biến thể Beta và Omicron [80].

Nghiên cứu của chúng tôi đã xác định được đặc điểm di truyền học của SARS-CoV-2 lưu hành trong đại dịch COVID-19 tại Việt Nam, đặc biệt xác định được sự tiến hoá nhanh của biến thể Delta, cùng với các đột biến liên quan đến sự tăng khả năng bám gắn của virus vào tế bào chủ cũng như sự nhân lên và lây truyền mạnh của SARS-CoV-2. Các thông tin trên hỗ trợ xây dựng chiến lược phòng chống dịch có hiệu quả tại Việt Nam cũng như chia sẻ với cộng đồng nghiên cứu trên toàn thế giới.

SARS-CoV-2 sẽ tiếp tục tiến hóa và có khả năng xuất hiện các biến chủng mới với đột biến trên gen S. vắc xin COVID-19 có thể cần được điều chỉnh định kỳ để đối phó với các biến chủng mới. Việc nghiên cứu và sản xuất vắc xin sẽ phải liên tục cập nhật dựa trên các đột biến được phát hiện. Sự đột biến liên tục của virus yêu cầu một hệ thống giám sát toàn cầu mạnh mẽ hơn, với việc giải trình tự gen trên diện rộng và hợp tác quốc tế để phát hiện sớm các biến chủng mới, giảm thiểu nguy cơ bùng phát dịch trên diện rộng.

## 4.3. TÍNH MỚI VÀ MỘT SỐ HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU

### *4.3.1. Tính mới của nghiên cứu*

1. Nghiên cứu đầu tiên công bố tổng thể sự lưu hành SARS-CoV-2 tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam giai đoạn 2020-2021. Kết quả luận án cung cấp thông tin về đặc điểm phân tử SARS-CoV-2, cho thấy sự tương đồng của virus lưu hành tại Việt Nam và trên thế giới ở cùng thời điểm, khẳng định sự ảnh hưởng mang tính toàn cầu của SARS-CoV-2.

2. Tỷ lệ nhiễm SARS-CoV-2 tại cộng đồng trong nghiên cứu là 1,0% thấp hơn tỷ lệ công bố của TCYTTG tại châu Âu, Đông Nam Á và châu Mỹ, là bằng

chứng cho chiến lược phòng chống dịch COVID-19 tại Việt Nam giai đoạn 2020-2021 là hiệu quả.

3. Nghiên cứu lần đầu tiên ghi nhận khả năng đào thải chậm của SARS-CoV-2 khi tỉ lệ SARS-CoV-2 dương tính 54,7% ở mẫu thứ hai, 21,2% ở mẫu thứ ba và trên 10% từ mẫu thứ 8 đến thứ 10 với khoảng cách lấy mẫu là 4 ngày.

4. Nghiên cứu đã cung cấp trình tự gen SARS-CoV-2 đầu tiên phân lập tại Việt Nam lên hệ thống GISAID ngay từ thời gian đầu của vụ dịch (10/2/2020, 3 ngày sau khi thực hiện phân lập thành công SARS-CoV-2 trên tế bào). Đây là dữ liệu quan trọng về SARS-CoV-2 của Việt Nam được thế giới ghi nhận.

5. Mười hai dòng virus khác nhau của SARS-CoV-2 thuộc nhóm virus Vũ Hán và 3 biến thể Alpha, Beta, Delta được ghi nhận từ kết quả của luận án. Trong đó, nhóm virus Vũ Hán được xác định có 7 dòng (19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20D, 20E-EU1; biến thể Alpha có dòng 20I/501Y.V1, một dòng biến thể Beta 20H/501Y.V2 và biến thể Delta có 3 dòng (21A, 21I và 21J). Biến thể Delta AY.57 được PANGOLIN ghi nhận là biến thể đặc trưng lưu hành tại Việt Nam. Luận án lần đầu tiên áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) để xác định các biến thể SARS-CoV-2 thâm nhập vào Việt Nam, xác định được những biến thể là căn nguyên chính của bốn làn sóng dịch trong cộng đồng tại Việt Nam. Kết quả cho thấy tính khả thi của thực hiện giám sát hệ gen của virus bằng kỹ thuật NGS.

### *4.3.2. Một số hạn chế của nghiên cứu*

Một số hạn chế của nghiên cứu được chúng tôi xác định như sau:

Thứ nhất, số lượng mẫu nghi nhiễm SARS-CoV-2 trong giai đoạn tháng 1/2020-8/2020 được chia theo 28 tỉnh/thành phố, tuy nhiên có cả thống kê từ Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương. Tại thời điểm đầu đại dịch, những bệnh nhân có triệu chứng tăng nặng nhập viện được chỉ định

điều trị tại 2 bệnh viện ở Hà Nội, với số lượng mẫu nhiều, thông tin trên phiếu thu thập mẫu khi tới Phòng thí nghiệm còn thiếu hụt. Vì vậy, nhóm nghiên cứu không có đủ thông tin bệnh nhân điều trị tại bệnh viện thuộc các tỉnh/thành phố nào.

Thứ hai, nghiên cứu xác định giá trị Ct và tải lượng virus trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong giai đoạn đầu đại dịch (1/2020-8/2020), so sánh giữa nhóm nhập cảnh và cộng đồng trong nước. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa thực hiện phân tích và so sánh tải lượng virus tại 3 làn sóng dịch tiếp theo với sự xuất hiện các biến thể Alpha, Beta và Delta để dự đoán độc lực và khả năng lây truyền của virus.

Thứ ba, nghiên cứu chưa phân tích so sánh các mẫu thu thập ở những trường hợp nhập cảnh tại khu cách ly với các virus lưu hành từ những nước nhập cảnh vào Việt Nam trong cùng thời gian. Hạn chế này do hệ thống GISAID tiếp nhận trình tự hệ gen của các nước trên thế giới muộn hơn rất nhiều so với thời gian virus được phát hiện nên nhóm nghiên cứu chưa có cơ hội tiếp cận với các thông tin trình tự mong muốn trong thời gian nghiên cứu.

Thứ tư, nghiên cứu chưa liên kết được các mẫu bệnh phẩm với biểu hiện lâm sàng, vì vậy chưa thể phân tích sâu các đột biến liên quan đến tăng tình trạng bệnh nặng hoặc tử vong. Hạn chế này cũng do điều kiện khách quan khi các đơn vị gửi mẫu chủ yếu từ Trung tâm kiểm soát bệnh tật tỉnh nên các thông tin về bệnh cảnh lâm sàng chưa được coi trọng.

# KẾT LUẬN

## 1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 trong các mẫu thu thập tại miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT- PCR, 2020-2021

Trong 8 tháng đầu của đại dịch COVID-19 (1/2020-8/2020), tỷ lệ nhiễm SARS-CoV-2 tại 28 tỉnh/thành phố miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam là 1,0% với 251 mẫu dương tính.

Kết quả ghi nhận khả năng đào thải chậm của SARS-CoV-2 khi tỉ lệ SARS-CoV-2 dương tính 54,7% ở mẫu thứ hai, 21,2% ở mẫu thứ ba và trên 10% từ mẫu thứ 8 đến thứ 10 với khoảng cách lấy mẫu là 4 ngày.

Giá trị Ct và tải lượng virus được tiến hành như một công cụ để dự đoán độc lực của virus. Giá trị Ct trung bình của mẫu bệnh phẩm dương tính là 28 chu kỳ (IQR 22,3-32, 14-38). Giá trị tải lượng virus trung bình là 8,4.107 copies/µl (IQR: 2,29.106 - 1,83.109 copies/µl, 1.95.103 – 4.95.1011), trong đó tải lượng virus ở mức cao có thể đóng vai trò cảnh báo để bắt đầu quá trình cách ly nhằm giảm khả năng lây truyền SARS-CoV-2.

Có mối tương quan chặt chẽ giữa giá trị Ct và tỷ lệ dương tính trong nuôi cấy virus, cho thấy rằng giá trị Ct có thể được sử dụng làm một tiêu chí xác định khả năng lây nhiễm SARS-CoV-2 trên người.

## 2. Đặc điểm phân tử của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020-2021

Trong giai đoạn 2020-2021, 12 dòng virus khác nhau của SARS - CoV-2 thuộc nhóm virus Vũ Hán và 3 biến thể Alpha, Beta, Delta được ghi nhận. Trong đó, nhóm virus Vũ Hán được xác định có 7 dòng (19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20D, 20E-EU1; biến thể Alpha (20I/501Y.V1) và biến thể Beta (20H/501Y.V2) có 1 dòng và biến thể Delta có 3 dòng (21A, 21I và 21J).

Trong năm 2020, dòng 20B lưu hành chủ yếu với 11 axit amin đột biến trên protein S, trong đó có đột biến D614G là đột biến quan trọng giúp protein S ổn định hơn, gắn chặt vào ACE-2 làm tăng khả năng lan truyền virus trong quần thể. Đây cũng là nguyên nhân chính của hai vụ dịch trong cộng đồng tại Hải Dương và Đà Nẵng năm 2020.

Biến thể Alpha/20I có nguồn gốc di truyền từ dòng 20B với 40 axit amin đột biến trên protein S đã tách nhánh để tạo thành một nhóm riêng biệt. Trong các vị trí đột biến, sự thay đổi tại vị trí N501Y đã làm thay đổi miền liên kết của protein S với thụ thể ACE-2 trên tế bào biểu mô đường hô hấp, dẫn đến khả năng lây truyền cao hơn so với các virus trước đó. Biến thể Alpha/20I là căn nguyên của 5 chùm ca bệnh gây vụ dịch tại 4 tỉnh/thành phố Đà Nẵng, Hải Dương, Quảng Ninh, Hà Nam từ tháng 1/2021-4/2021.

Biến thể Delta với 3 dòng 21A, 21I và 21J được ghi nhận từ cuối tháng 4/2021. Các virus lưu hành tại Việt Nam mang đầy đủ các đột biến quan trọng của biến thể Delta là D614G, L452R, P681R, T478K và có thêm các đột biến đặc trưng D142G trên protein S, P380S trên ORF1a, cùng với các đột biến khác trên protein M, ORF3a, ORF 7a, ORF 8, ORF 9b tạo nên biến thể AY.57. Biến thể Delta/AY.57 (90,5%) chiếm ưu thế, đã được Pangoli ghi nhận là một dòng virus đặc trưng lưu hành tại Việt Nam.

# KHUYẾN NGHỊ

Từ những kết quả nghiên cứu trên chúng tôi đưa ra một số khuyến nghị sau:

1. Phát triển chiến lược giám sát SARS-CoV-2 thông qua giải trình tự gen thế hệ mới (NGS): Xây dựng và triển khai một hệ thống giám sát gen để theo dõi sự tiến hóa và biến đổi của SARS-CoV-2. Điều này sẽ cho phép Việt Nam tiếp cận với hệ thống giám sát dịch toàn cầu, giúp phát hiện sớm các biến thể mới, đánh giá sự lây lan trong cộng đồng, và tối ưu hóa các biện pháp phòng chống dịch.
2. Phân tích mối liên quan giữa bệnh cảnh lâm sàng và sự thay đổi trong hệ gen SARS-CoV-2 tại Việt Nam: Cần thực hiện nghiên cứu chuyên sâu về sự liên hệ giữa các biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân COVID-19 và các đột biến trong hệ gen virus. Đặc biệt, nghiên cứu các đột biến có thể gây ảnh hưởng đến mức độ nghiêm trọng của bệnh và tỷ lệ tử vong sẽ giúp cung cấp cơ sở khoa học để phát triển các phương pháp điều trị hiệu quả hơn và điều chỉnh các chiến lược y tế phù hợp với tình hình dịch bệnh trong nước.

# DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

1. **Nguyen Vu Son**, Ung Thi Hong Trang, Hoang Vu Mai Phuong, Le Thi Thanh, Nguyen Co Thach, Nguyen Le Khanh Hang, Vuong Duc Cuong, Nguyen Phuong Anh, Tran Thi Thu Huong, Le Thi Quynh Mai (2022). Genetic variants of SARS-CoV-2 circulated from Northern and Central Vietnam from January 2020 - April 2021. Vietnam Journal of Preventive Medicine 2022; 32 (9): 62 – 71. DOI: https://doi.org/10.51403/0868-2836/2022/924.
2. **Nguyễn Vũ Sơn**, Ứng Thị Hồng Trang, Hoàng Vũ Mai Phương, Vương Đức Cường, Nguyễn Phương Anh, Lê Thị Thanh, Lê Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Lê Khánh Hằng (2023). Đặc điểm di truyền học của biến thể SARS-CoV-2 Delta lưu hành tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2021. Tạp chí Y học dự phòng, 33 (6): 31-39. DOI: https://doi.org/10.51403/0868-2836/2023/1379.
3. Hang Khanh Le Nguyen, **Son Vu Nguyen**, Phuong Mai Vu Hoang, Thanh thi Le, Huong thi Thu Tran, Long Hai Pham Nguyen, Thai Quang Pham, Thuy thanh Nguyen, Anh Duc Dang, Anh Phuong Nguyen and Mai thi Quynh Le (2021). Virological characteristics of cases of COVID-19 in northern Viet Nam, January–May 2020. Western Pacific surveillance and response, WPSAR Vol 12, No 4, 2021 | doi: 10.5365/wpsar.2021.12.4.833.
4. Hoang Vu Mai Phuong, Ung Thi Hong Trang, **Nguyen Vu Son**, Le Thi Thanh, Nguyen Le Khanh Hang, Vuong Duc Cuong, Tran Thi Thu Huong, Pham Thi Hien, Nguyen Phuong Anh, Nguyen Co Thach, Le Thi Quynh Mai (2020). Detecting SARS-CoV-2 by Realtime RT-PCR in clinical samples collected in the North of Vietnam. Vietnam Journal of Preventive Medicine, 2020, 30 (9): 11-17. DOI: https://doi.org/10.51403/0868-2836/2020/114

# TÀI LIỆU THAM KHẢO

## Tiếng Việt


1. Bộ Y tế, "Tổ chức Y tế Thế giới đưa ra công bố dịch Covid-19 không còn được coi là tình trạng khẩn cấp về sức khỏe cộng đồng″(08/10/2023).
2. Bộ Y tế (2020), "Quyết định 3351/QĐ-BYT ″, *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị COVID 19 do chủng vi rút Corona mới*.
3. Bộ Y tế (2020), "Quyết định 3468/QĐ-BYT″, *Hướng dẫn tạm thời giám sát và phòng chống COVID-19*.
4. Bộ Y tế (2021), "Công văn số 6929/BYT-TB-CT ″, *Danh sách các sinh phẩm. trang thiết bị y tế chẩn đoán in vitro xét nghiệm SARS-Cov-2 đã được cấp số đăng ký, GPNK (cập nhật lần 7).*
5. Bộ Y tế (2023), "Quyết định 3896/QĐ-BYT″, *Về việc điều chỉnh bệnh viêm đường hô hấp cấp do chủng mới của vỉ rút Corona gây ra (COVID-19) từ bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm A sang bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm B của Luật phòng, chống bệnh truyền nhiễm 2007.*


## Tiếng Anh


6. Ramos, A. N., Jr. (2024), "Long COVID challenges in Brazil: an unfinished agenda for the Brazilian Unified National Health System″, *Cad Saude Publica*. 40(2), p. e00008724.
7. Abduljalil, J. M. and Abduljalil, B. M. (2020), "Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view″, *New Microbes New Infect*. 35, p. 100672.
8. Abdulla, Z. A., Al-Bashir, S. M., Al-Salih, N. S., et al. (2021), "A Summary of the SARS-CoV-2 Vaccines and Technologies Available or under Development″, *Pathogens*. 10(7).
9. Abebe, E. C., Dejenie, T. A., Shiferaw, M. Y., et al. (2020), "The newly emerged COVID-19 disease: a systemic review″, *Virol J*. 17(1), p. 96.
10. Alizon, S., Selinger, C., Sofonea, M. T., et al. (2022), "Epidemiological and clinical insights from SARS-CoV-2 RT-PCR crossing threshold values, France, January to November 2020″, *Euro Surveill*. 27(6).
11. Andrews, N., Stowe, J., Kirsebom, F., et al. (2022), "Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant″, *N Engl J Med*. 386(16), pp. 1532-1546.
12. Benvenuto, D., Giovanetti, M., Ciccozzi, A., et al. (2020), "The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution″, *J Med Virol*. 92(4), pp. 455-459.
13. Bertram, S., Dijkman, R., Habjan, M., et al. (2013), "TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium″, *J Virol*. 87(11), pp. 6150-60.

14. Bevova, M. R., Netesov, S. V., and Aulchenko, Y. S. (2020), "The New Coronavirus COVID-19 Infection", *Mol Gen Microbiol Virol*. 35(2), pp. 53-60.

15. Bianchi, M., Benvenuto, D., Giovanetti, M., et al. (2020), "Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics?", *Biomed Res Int*. 2020, p. 4389089.

16. Boson, B., Legros, V., Zhou, B., et al. (2021), "The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles", *J Biol Chem*. 296, p. 100111.

17. Brito, A. F., Semenova, E., Dudas, G., et al. (2022), "Global disparities in SARS-CoV-2 genomic surveillance", *Nat Commun*. 13(1), p. 7003.

18. Calistri, P., Danzetta, M. L., Amato, L., et al. (2021), "Epidemiological Significance of SARS-CoV-2 RNA Dynamic in Naso-Pharyngeal Swabs", *Microorganisms*. 9(6).

19. Cao, Y., Yang, R., Lee, I., et al. (2021), "Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors", *Protein Sci*. 30(6), pp. 1114-1130.

20. Cascella, M., Rajnik, M., Aleem, A., et al. (2024), "Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)", *StatPearls*, StatPearls Publishing

21. Chang, S., Shin, K. S., Park, B., et al. (2024), "Strategy to develop broadly effective multivalent COVID-19 vaccines against emerging variants based on Ad5/35 platform", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 121(10), p. e2313681121.

22. Chatterjee, B. and Thakur, S. S. (2022), "Diverse vaccine platforms safeguarding against SARS-CoV-2 and its variants", *Expert Rev Vaccines*. 21(1), pp. 47-67.

23. Chavda, V. P., Patel, A. B., and Vaghasiya, D. D. (2022), "SARS-CoV-2 variants and vulnerability at the global level", *J Med Virol*. 94(7), pp. 2986-3005.

24. Cherian, S., Potdar, V., Jadhav, S., et al. (2021), "SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India", *Microorganisms*. 9(7).

25. Choi, J. Y. and Smith, D. M. (2021), "SARS-CoV-2 Variants of Concern", *Yonsei Med J*. 62(11), pp. 961-968.

26. Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., et al. (2020), "Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia", *Clin Chem*. 66(4), pp. 549-555.

27. Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., et al. (2020), "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR", *Euro Surveill*. 25(3).

28. Cucinotta, D. and Vanelli, M. (2020), "WHO Declares COVID-19 a Pandemic", *Acta Biomed*. 91(1), pp. 157-160.

29. Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., et al. (2021), "Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England", *Science*. 372(6538).

30. Davies, N. G., Jarvis, C. I., Edmunds, W. J., et al. (2021), "Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7", *Nature*. 593(7858), pp. 270-274.

31. Demers-Mathieu, V., Do, D. M., Mathijssen, G. B., et al. (2021), "Difference in levels of SARS-CoV-2 S1 and S2 subunits- and nucleocapsid protein-reactive SIgM/IgM, IgG and SIgA/IgA antibodies in human milk", *J Perinatol*. 41(4), pp. 850-859.

32. Deng, S. Q. and Peng, H. J. (2020), "Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China", *J Clin Med*. 9(2).

33. Development, International Institute for Sustainable *WHO Declares End to COVID-19 as Global Health Emergency*, accessed, from https://sdg.iisd.org/news/who-declares-end-to-covid-19-as-global-health-emergency/.

34. Dhama, K., Khan, S., Tiwari, R., et al. (2020), "Coronavirus Disease 2019-COVID-19", *Clin Microbiol Rev*. 33(4).

35. Diesel, J., Sterrett, N., Dasgupta, S., et al. (2021), "COVID-19 Vaccination Coverage Among Adults - United States, December 14, 2020-May 22, 2021", *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 70(25), pp. 922-927.

36. Dinesh, D. C., Chalupska, D., Silhan, J., et al. (2020), "Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein", *PLoS Pathog*. 16(12), p. e1009100.

37. Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., et al. (2020), "The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens", *Front Immunol*. 11, p. 576622.

38. Eden, John-Sebastien (2020), *NEAR-WHOLE GENOME SEQUENCING OF SARS-CoV-2 USING POOLED AMPLICONS ON ILLUMINA PLATFORMS*, [Unpublished report].

39. Ferré, V. M., Peiffer-Smadja, N., Visseaux, B., et al. (2022), "Omicron SARS-CoV-2 variant: What we know and what we don't", *Anaesth Crit Care Pain Med*. 41(1), p. 100998.

40. Ghafari, M., du Plessis, L., Raghwani, J., et al. (2022), "Purifying Selection Determines the Short-Term Time Dependency of Evolutionary Rates in SARS-CoV-2 and pH1N1 Influenza", *Mol Biol Evol*. 39(2).

41. Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., et al. (2020), "The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status", *Mil Med Res*. 7(1), p. 11.

42. Gupta, R., Charron, J., Stenger, C. L., et al. (2020), "SARS-CoV-2 (COVID-19) structural and evolutionary dynamicome: Insights into functional evolution and human genomics", *J Biol Chem*. 295(33), pp. 11742-11753.

43. Hillary, V. E. and Ceasar, S. A. (2023), "An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines", *Heliyon*. 9(3), p. e13952.

44. Holmes, Edward C., Dudas, Gytis, Rambaut, Andrew, et al. (2016), "The evolution of Ebola virus: Insights from the 2013–2016 epidemic", *Nature*. 538(7624), pp. 193-200.

45. Hou, H., Wang, T., Zhang, B., et al. (2020), "Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019", *Clin Transl Immunology*. 9(5), p. e01136.

46. Hu, B., Guo, H., Zhou, P., et al. (2021), "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19", *Nat Rev Microbiol*. 19(3), pp. 141-154.

47. Huang, C. G., Lee, K. M., Hsiao, M. J., et al. (2020), "Culture-Based Virus Isolation To Evaluate Potential Infectivity of Clinical Specimens Tested for COVID-19", *J Clin Microbiol*. 58(8).

48. Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., et al. (2020), "Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19", *Acta Pharmacol Sin*. 41(9), pp. 1141-1149.

49. Jahirul Islam, M., Nawal Islam, N., Siddik Alom, M., et al. (2023), "A review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites", *Immunobiology*. 228(1), p. 152302.

50. Ji, W. (2021), "Coronaviruses: What Should We Know About the Characteristics of Viruses?", *Adv Exp Med Biol*. 1318, pp. 23-39.

51. Jin, Y., Ouyang, M., Yu, T., et al. (2022), "Genome-Wide Analysis of the Indispensable Role of Non-structural Proteins in the Replication of SARS-CoV-2", *Front Microbiol*. 13, p. 907422.

52. Kakavandi, S., Zare, I., VaezJalali, M., et al. (2023), "Structural and non-structural proteins in SARS-CoV-2: potential aspects to COVID-19 treatment or prevention of progression of related diseases", *Cell Commun Signal*. 21(1), p. 110.

53. Khetran, S. R. and Mustafa, R. (2023), "Mutations of SARS-CoV-2 Structural Proteins in the Alpha, Beta, Gamma, and Delta Variants: Bioinformatics Analysis", *JMIR Bioinform Biotech*. 4, p. e43906.

54. Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., et al. (2020), "The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome", *Cell*. 181(4), pp. 914-921.e10.

55. Kim, K. H., Tandi, T. E., Choi, J. W., et al. (2017), "Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) outbreak in South Korea, 2015: epidemiology, characteristics and public health implications", *J Hosp Infect*. 95(2), pp. 207-213.

56. Krammer, F. (2020), "SARS-CoV-2 vaccines in development", *Nature*. 586(7830), pp. 516-527.

57. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., et al. (2005), "A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury", *Nat Med*. 11(8), pp. 875-9.

58. La Scola, B., Le Bideau, M., Andreani, J., et al. (2020), "Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 39(6), pp. 1059-1061.

59. Lan, Lan, Xu, Dan, Ye, Guangming, et al. (2020), "Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19", *JAMA*. 323(15), pp. 1502-1503.

60. Le, T. Q. M., Takemura, T., Moi, M. L., et al. (2020), "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Shedding by Travelers, Vietnam, 2020", *Emerg Infect Dis*. 26(7), pp. 1624-1626.

61. Lenharo, M. (2023), "WHO declares end to COVID-19's emergency phase", *Nature*.

62. Li, G., Hilgenfeld, R., Whitley, R., et al. (2023), "Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned", *Nat Rev Drug Discov*. 22(6), pp. 449-475.

63. Li, G., Zhou, Z., Du, P., et al. (2021), "The SARS-CoV-2 spike L452R-E484Q variant in the Indian B.1.617 strain showed significant reduction in the neutralization activity of immune sera", *Precis Clin Med*. 4(3), pp. 149-154.

64. Li, Jing-Xing, Liao, Pei-Lun, Wei, James Cheng-Chung, et al. (2023), "A chronological review of COVID-19 case fatality rate and its secular trend and investigation of all-cause mortality and hospitalization during the Delta and Omicron waves in the United States: a retrospective cohort study", *Frontiers in Public Health*. 11.

65. Li, W., Zhang, C., Sui, J., et al. (2005), "Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2", *Embo j*. 24(8), pp. 1634-43.

66. Li, X. N., Huang, Y., Wang, W., et al. (2021), "Effectiveness of inactivated SARS-CoV-2 vaccines against the Delta variant infection in Guangzhou: a test-negative case-control real-world study", *Emerg Microbes Infect*. 10(1), pp. 1751-1759.

67. Ling, R., Dai, Y., Huang, B., et al. (2020), "In silico design of antiviral peptides targeting the spike protein of SARS-CoV-2", *Peptides*. 130, p. 170328.

68. Liu, D. X., Fung, T. S., Chong, K. K., et al. (2014), "Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses", *Antiviral Res*. 109, pp. 97-109.

69. Lowe, C. F., Matic, N., Ritchie, G., et al. (2020), "Detection of low levels of SARS-CoV-2 RNA from nasopharyngeal swabs using three commercial molecular assays", *J Clin Virol*. 128, p. 104387.

70. Luo, L., Liu, D., Liao, X., et al. (2020), "Contact Settings and Risk for Transmission in 3410 Close Contacts of Patients With COVID-19 in Guangzhou, China : A Prospective Cohort Study", *Ann Intern Med*. 173(11), pp. 879-887.

71. Maechler, F., Gertler, M., Hermes, J., et al. (2020), "Epidemiological and clinical characteristics of SARS-CoV-2 infections at a testing site in Berlin, Germany, March and April 2020-a cross-sectional study", *Clin Microbiol Infect*. 26(12), pp. 1685.e7-1685.e12.

72. Malik, Y. S., Sircar, S., Bhat, S., et al. (2020), "Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)-current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments", *Vet Q*. 40(1), pp. 68-76.

73. Markov, Peter V., Ghafari, Mahan, Beer, Martin, et al. (2023), "The evolution of SARS-CoV-2", *Nature Reviews Microbiology*. 21(6), pp. 361-379.

74. Marques-Pereira, C., Pires, M. N., Gouveia, R. P., et al. (2022), "SARS-CoV-2 Membrane Protein: From Genomic Data to Structural New Insights", *Int J Mol Sci*. 23(6).

75. Marwan, Marwan, Winardi, Wira, Mu'ti, Abdul, et al. (2022), "Detection of SARS-CoV-2 Delta Variant of Concern AY.57 and Clinical Characteristics of Imported Cases on a Vietnamese Coal Carrier Vessel in East Kalimantan, Indonesia: A Case Report", *Jurnal Respirasi*. 8(2), pp. 99-105.

76. Meirson, T., Bomze, D., and Markel, G. (2021), "Structural basis of SARS-CoV-2 spike protein induced by ACE2", *Bioinformatics*. 37(7), pp. 929-936.

77. Men, K., Li, Y., Wang, X., et al. (2023), "Estimate the incubation period of coronavirus 2019 (COVID-19)", *Comput Biol Med*. 158, p. 106794.

78. Meyer, A. G., Spielman, S. J., Bedford, T., et al. (2015), "Time dependence of evolutionary metrics during the 2009 pandemic influenza virus outbreak", *Virus Evol*. 1(1).

79. Minh, Le Huu Nhat, Khoi Quan, Nguyen, Le, Tran Nhat, et al. (2021), "COVID-19 Timeline of Vietnam: Important Milestones Through Four Waves of the Pandemic and Lesson Learned", *Frontiers in Public Health*. 9.

80. Moderna, Inc *Moderna Announces Clinical Update on Bivalent COVID-19 Booster Platform*, accessed, from https://investors.modernatx.com/news/news-details/2022/Moderna-Announces-Clinical-Update-on-Bivalent-COVID-19-Booster-Platform/default.aspx.

81. Mohd, H. A., Al-Tawfiq, J. A., and Memish, Z. A. (2016), "Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir", *Virol J*. 13, p. 87.

82. Morse, M., Sefcikova, J., Rouzina, I., et al. (2023), "Structural domains of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein coordinate to compact long nucleic acid substrates", *Nucleic Acids Res*. 51(1), pp. 290-303.

83. Mwenda, M., Saasa, N., Sinyange, N., et al. (2021), "Detection of B.1.351 SARS-CoV-2 Variant Strain - Zambia, December 2020", *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 70(8), pp. 280-282.

84. Nextstrain *Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally over the past 6 months*, accessed 26th December 2021, from https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m?dmax=2021-12-26.

85. Nextstrain *SARS-CoV-2 clade naming strategy for 2022*, accessed, from https://nextstrain.org/blog/2022-04-29-SARS-CoV-2-clade-naming-2022.

86. O'Toole, Á, Hill, V., Pybus, O. G., et al. (2021), "Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and B.1.351/501Y-V2 with grinch", *Wellcome Open Res*. 6, p. 121.

87. Ogando, N. S., Dalebout, T. J., Zevenhoven-Dobbe, J. C., et al. (2020), "SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology", *J Gen Virol*. 101(9), pp. 925-940.

88. Okamaoto, K., Shirato, K., Nao, N., et al. (2020), "Assessment of Real-Time RT-PCR Kits for SARS-CoV-2 Detection", *Jpn J Infect Dis*. 73(5), pp. 366-368.

89. Organization, World Health *COVID-19 vaccine tracker and landscape*, accessed, from https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines.

90. Organization, World Health, "Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR".

91. Organization, World Health (2020), *Coronavirus Disease (COVID-19)*, accessed, from https://covid19.who.int/.

92. Ou, X., Liu, Y., Lei, X., et al. (2020), "Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV", *Nat Commun*. 11(1), p. 1620.

93. Papa Mze, N., Kacel, I., Beye, M., et al. (2023), "High Throughput SARS-CoV-2 Genome Sequencing from 384 Respiratory Samples Using the Illumina COVIDSeq Protocol", *Genes (Basel)*. 14(3).

94. Pather, S., Madhi, S. A., Cowling, B. J., et al. (2023), "SARS-CoV-2 Omicron variants: burden of disease, impact on vaccine effectiveness and need for variant-adapted vaccines", *Front Immunol*. 14, p. 1130539.

95. Peñarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., et al. (2020), "Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak", *Int J Infect Dis*. 97, pp. 225-229.

96. Phan, T. (2020), "Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2", *Infect Genet Evol*. 81, p. 104260.

97. Qiao, Xi-Min, Xu, Xiao-Feng, Zi, Hao, et al. (2020), "Re-positive Cases of Nucleic Acid Tests in Discharged Patients With COVID-19: A Follow-Up Study", *Frontiers in Medicine*. 7.

98. Quach, H. L., Nguyen, K. C., Hoang, N. A., et al. (2021), "Association of public health interventions and COVID-19 incidence in Vietnam, January to December 2020", *Int J Infect Dis*. 110 Suppl 1, pp. S28-s43.

99. Quayum, S. T. and Hasan, S. (2021), "Analysing the impact of the two most common SARS-CoV-2 nucleocapsid protein variants on interactions with membrane protein in silico", *J Genet Eng Biotechnol*. 19(1), p. 138.

100. Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., et al. (2020), "SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview", *Infez Med*. 28(2), pp. 174-184.

101. Rahman, Md Mijanur, Masum, Md Habib Ullah, Wajed, Shah, et al. (2022), "A comprehensive review on COVID-19 vaccines: development, effectiveness, adverse effects, distribution and challenges", *VirusDisease*. 33(1), pp. 1-22.

102. Raj, V. S., Mou, H., Smits, S. L., et al. (2013), "Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC", *Nature*. 495(7440), pp. 251-4.

103. Ratcliff, J., Al-Beidh, F., Bibi, S., et al. (2022), "Highly Sensitive Lineage Discrimination of SARS-CoV-2 Variants through Allele-Specific Probe PCR", *J Clin Microbiol*. 60(4), p. e0228321.

104. Rothan, H. A. and Byrareddy, S. N. (2020), "The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak", *J Autoimmun*. 109, p. 102433.

105. Sarkar, M. and Madabhavi, I. (2022), "SARS-CoV-2 variants of concern: a review", *Monaldi Arch Chest Dis*. 93(3).

106. Scherer, K. M., Mascheroni, L., Carnell, G. W., et al. (2022), "SARS-CoV-2 nucleocapsid protein adheres to replication organelles before viral assembly at the Golgi/ERGIC and lysosome-mediated egress", *Sci Adv*. 8(1), p. eabl4895.

107. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., et al. (2020), "Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(21), pp. 11727-11734.

108. Shim, E. (2021), "Projecting the Impact of SARS-CoV-2 Variants and the Vaccination Program on the Fourth Wave of the COVID-19 Pandemic in South Korea", *Int J Environ Res Public Health*. 18(14).

109. Singanayagam, A., Patel, M., Charlett, A., et al. (2020), "Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020", *Euro Surveill*. 25(32).

110. Singh, S. K. (2016), "Middle East Respiratory Syndrome Virus Pathogenesis", *Semin Respir Crit Care Med*. 37(4), pp. 572-7.

111. Starr, T. N., Greaney, A. J., Dingens, A. S., et al. (2021), "Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016", *bioRxiv*.

112. Tam, N. T., Anh, N. T., Tung, T. S., et al. (2023), "Spatiotemporal Evolution of SARS-CoV-2 Alpha and Delta Variants during Large Nationwide Outbreak of COVID-19, Vietnam, 2021", *Emerg Infect Dis*. 29(5), pp. 1002-1006.

113. Thomas, S. (2021), "Mapping the Nonstructural Transmembrane Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2", *J Comput Biol*. 28(9), pp. 909-921.

114. Trbojević-Akmačić, I., Petrović, T., and Lauc, G. (2021), "SARS-CoV-2 S glycoprotein binding to multiple host receptors enables cell entry and infection", *Glycoconj J*. 38(5), pp. 611-623.

115. Vu, H. T., Leitmeyer, K. C., Le, D. H., et al. (2004), "Clinical description of a completed outbreak of SARS in Vietnam, February-May 2003", *Emerg Infect Dis*. 10(2), pp. 334-8.

116. Walker, A. S., Pritchard, E., House, T., et al. (2021), "Ct threshold values, a proxy for viral load in community SARS-CoV-2 cases, demonstrate wide variation across populations and over time", *Elife*. 10.

117. Worobey, M., Levy, J. I., Malpica Serrano, L., et al. (2022), "The Huanan Seafood Wholesale Market in Wuhan was the early epicenter of the COVID-19 pandemic", *Science*. 377(6609), pp. 951-959.

118. Wu, A., Wang, L., Zhou, H. Y., et al. (2021), "One year of SARS-CoV-2 evolution", *Cell Host Microbe*. 29(4), pp. 503-507.

119. Wu, W., Cheng, Y., Zhou, H., et al. (2023), "The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics", *Virol J*. 20(1), p. 6.

120. Y, Hewings-Martin (2021), *COVID-19: Which Vaccines are Effective against the Delta Variant?*, Medical News Today, accessed 27 February 2022, from https://www.medicalnewstoday.com/articles/covid-19-which-vaccines-are-effective-against-the-delta-variant.

121. Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., et al. (2020), "Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2", *Science*. 367(6485), pp. 1444-1448.

122. Yang, H. and Rao, Z. (2021), "Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development", *Nat Rev Microbiol*. 19(11), pp. 685-700.

123. Yang, T. J., Yu, P. Y., Chang, Y. C., et al. (2021), "Effect of SARS-CoV-2 B.1.1.7 mutations on spike protein structure and function", *Nat Struct Mol Biol*. 28(9), pp. 731-739.

124. Yin, N., Dellicour, S., Daubie, V., et al. (2021), "Leveraging of SARS-CoV-2 PCR Cycle Thresholds Values to Forecast COVID-19 Trends", *Front Med (Lausanne)*. 8, p. 743988.

125. Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E., et al. (2020), "Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant", *Cell*. 183(3), pp. 739-751.e8.

126. Zhan, Y., Yin, H., and Yin, J. Y. (2022), "B.1.617.2 (Delta) Variant of SARS-CoV-2: features, transmission and potential strategies", *Int J Biol Sci*. 18(5), pp. 1844-1851.

127. Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., et al. (2020), "SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity", *Nat Commun*. 11(1), p. 6013.

128. Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., et al. (2020), "The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity", *bioRxiv*.

129. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., et al. (2020), "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin", *Nature*. 579(7798), pp. 270-273.

130. Zumla, A., Hui, D. S., and Perlman, S. (2015), "Middle East respiratory syndrome", *Lancet*. 386(9997), pp. 995-1007.

131. (NMDC), National Microbiology Data Center (2020), "Novel coronavirus national science and technology resource service system".

132. Galloway, S. E., Paul, P., MacCannell, D. R., et al. (2021), "Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021", *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 70(3), pp. 95-99.

133. Harris, Emily (2023), "WHO Declares End of COVID-19 Global Health Emergency", *JAMA*. 329(21), pp. 1817-1817.

134. Kim D, Lee J-Y, Yang J-S, Kim JW, Kim VN, Chang H (2020), "The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome", *Cell* 181(4), pp. 914–921 (e910).

135. Kumar, Suresh, Thambiraja, Thiviya S., Karuppanan, Kalimuthu, et al. (2021), "Omicron and Delta Variant of SARS-CoV-2: A Comparative Computational Study of Spike protein", *bioRxiv*, p. 2021.12.02.470946.

136. Larsson, Anders (2014), "AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets", *Bioinformatics*. 30(22), pp. 3276-3278.

137. Li J, Guo M, Tian X, Liu C, Wang X, Yang X, Wu P, Xiao Z, Qu Y, Yin Y, Fu J, Zhu Z, Liu Z, Peng C, Zhu T, Liang Q (2020), "Virus-host interactome and proteomic survey of PMBCs from COVID-19 patients reveal potential virulence factors influencing SARS-CoV-2 pathogenesis.", *bioRxiv*.

138. Phuong, Hoang Vu Mai, Trang, Ung Thi Hong, Son, Nguyen Vu, et al. (2021), "Detecting SARS-CoV-2 by Realtime RT-PCR in clinical samples collected in

the North of Vietnam″, *Vietnam Journal of Preventive Medicine-VJPM*. 30(9), pp. 11-17.

139. Rahman, Mijanur, Masum, Md Habib, Wajed, Shah, et al. (2022), "A comprehensive review on COVID-19 vaccines: development, effectiveness, adverse effects, distribution and challenges″, *VirusDisease*. 33.

140. Soheili, Marzieh, Khateri, Sorour, Moradpour, Farhad, et al. (2023), "The efficacy and effectiveness of COVID-19 vaccines around the world: a mini-review and meta-analysis″, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 22(1), p. 42.

141. Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., et al. (2021), "The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants″, *Nat Rev Genet*.

142. Ung Thi, Hong, Phuong, Hoang Vu Mai, Son, Nguyen Vu, et al. (2021), "Exploring SARS-CoV-2 genome with iSeq 100 Next Generation Sequencing″, *Vietnam Journal of Preventive Medicine*. 30(9), pp. 18-25.

143. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., et al. (2020), "Site-specific analysis of the SARS-CoV-2 glycan shield″, *bioRxiv*.

144. WHO, "Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. ″.

145. WHO (2023), "Statement on the Fifteenth Meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee Regarding the Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic″.

146. Wu, Z. and McGoogan, J. M. (2020), "Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention″, *JAMA*. 323(13), pp. 1239-1242.

147. Yoshimoto, Francis K. (2020), "The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19″, *The Protein Journal*. 39(3), pp. 198-216.

| | | |
|---|---|---|
| | **VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**<br>**QUY TRÌNH KỸ THUẬT REALTIME RT-PCR PHÁT HIỆN VI RÚT nCoV (SARS-CoV-2)** | Mã số: *NV05-VR02-QT5.5.5*<br>Lần ban hành: *1.1*<br>Ngày hiệu lực: *30/01 /2020*<br>Tổng số trang: |

| | Họ tên | Ký tên | Ngày |
|---|---|---|---|
| **Biên soạn** | Lê Thị Thanh | | 20 / 01 / 2020 |
| | Ứng Thị Hồng Trang | | 20 / 01 / 2020 |
| **Xem xét** | Hoàng Vũ Mai Phương | | 23 / 01 / 2020 |
| **Phê duyệt** | Lê Thị Quỳnh Mai | | 24 / 01 / 2020 |

## THEO DÕI LỊCH SỬ TÀI LIỆU

| Ngày hiệu lực | Lần ban hành | Nội dung sửa đổi | Vị trí sửa đổi |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

QLCL : Quản lý chất lượng

VSDTTƯ : Vệ sinh dịch tễ Trung ương

**5. Nguyên lý**

Real-time RT-PCR TaqMan là một phương pháp in vitro để tổng hợp và định lượng tương đối/tuyệt đối (nếu có gam chuẩn ngoài) một trình tự xác định ARN.

Vì ARN không thể làm khuôn mẫu trực tiếp cho PCR nên trước tiên, nó được phiên mã ngược (RT) để trở thành ADN bổ trợ (cDNA). Real-time PCR sử dụng hai đoạn mồi (primer) đặc hiệu với chuỗi bổ trợ để tổng hợp chuỗi nhờ enzyme taq polymerase và một hoặc nhiều đầu dò (probe) đặc hiệu nằm giữa hai đoạn mồi để định lượng. Thông thường, đầu dò mang huỳnh quang ở một đầu (chất mang - reporter-5') và chất chặn ở đầu kia (quencher-3'), do hai chất này ở gần nhau (khoảng 18-35 nucleotide) nên chất huỳnh quang truyền năng lượng tới chất chặn chứ không phát quang nên ta không thu được tín hiệu huỳnh quang.

Khi phản ứng bắt đầu, sau giai đoạn biến tính ADN, ở giai đoạn gắn mồi, cả mồi và đầu dò đều gắn đặc hiệu vào ADN đích. Quá trình tổng hợp chuỗi được thực hiện từ vị trí các mồi và khi taq polymerase chạm vào đầu dò thì hoạt tính 5'-3'exonuclease của enzyme này phá hủy đầu dò, tách chất mang khỏi chất chặn nên giải phóng chất huỳnh quang ở trạng thái tự do và phát quang. Máy sẽ đo tín hiệu phát quang này sau mỗi chu kỳ nhiệt. Lượng tăng trung bình nhân chất huỳnh quang tương ứng với lượng tăng cấp số mũ của sản phẩm và được sử dụng để xác định chu kỳ ngưỡng (Ct) của mỗi phản ứng. Trong real-time PCR, giai đoạn gắn mồi và tổng hợp chuỗi có thể gộp làm một nên chu kỳ nhiệt chỉ thường có hai bước. Khi các giai đoạn của real-time RT-PCR được thực hiện kết hợp trong một lần làm phản ứng thì gọi là real-time RT-PCR một bước (one step).

**6. An toàn**

Tuân thủ nguyên tắc thực hành ATSH cấp 2 theo cấp độ nguy cơ của tác nhân tương ứng với kỹ thuật thực hiện theo quy định trong Sổ tay an toàn do Viện VSDTTƯ ban hành (mã số: STAT).

**7. Đặc trưng kỹ thuật**

- Độ đặc hiệu: 100%
- Độ nhạy: 99%

Hạn chế:

+ Âm tính giả do sự có mặt của một số yếu tố ức chế có trong mẫu

+ Dương tính giả do sản phẩm không đặc hiệu
+ Có khả năng bị tạp nhiễm trong quá trình làm

## 8. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

### 8.1. Nguyên vật liệu

8.1.1. Sinh phẩm, hoá chất

- **Sinh phẩm tách chiết RNA/DNA**: theo quy trình NV05-VR-QT5.5.02
- **Sinh phẩm khuếch đại**: **SuperScrip™III Platium One-Step:** Thermo Fisher 11732-088/11732-020 hoặc **TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG**: A15299/A15300 hoặc **QuantabioqScript® XLT One-Step RT-qPCR ToughMix:** 95132-100/95132-500.
- **Mồi (primer)– Đầu dò (probe) chẩn đoán**:

  + Các ống mồi và probe riêng biệt được tổng hợp theo trình tự mồi của phòng thí nghiệm chuẩn thức của Tổ chức Y tế Thế giới Charite – Berlin (World Health Organization - Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR (Berlin, Jan 17th, 2020)):

| STT | Tên mồi | | Trình tự |
|---|---|---|---|
| 1 | RdRP gene | RdRP_SARSr-F2 | GTGARATGGTCATGTGTGGCGG |
| | | RdRP_SARSr-R1 | CARATGTTAAASACACTATTAGCATA |
| | | RdRP_SARSr-P2 | FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ |
| 2 | E gene | E_Sarbeco_F1 | ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT |
| | | E_Sarbeco_R2 | ATATTGCAGCAGTACGCACACA |
| | | E_Sarbeco_P1 | FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ |
| 3 | N gene | N_Sarbeco_F1 | CACATTGGCACCCGCAATC |
| | | N_Sarbeco_R2 | GAGGAACGAGAAGAGGCTTG |
| | | N_Sarbeco_P1 | FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ |

W: A/T; R: G/A; M: A/C ; FAM, 6-carboxyfluorescein; BBQ, blackberry quencher

Hoặc

+ Bộ mồi ***LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control*** (TibMolBiol - Đức) gồm các thành phần: Hỗn hợp mồi và đầu dò khuếch đại phát hiện gene E, gen RdRp SARS-

CoV-2; Chứng dương; Nội chứng.

- Điều kiện bảo quản vật tư: theo hướng dẫn tại quy trình quản lý hàng hoá QL04-QĐ02.

8.1.2. Vật tư tiêu hao

- Tuýp vô trùng các thể tích 1.5 ml, 1.7 ml, 1.8 ml, 2.0 ml
- Tuýp 2.0 ml nắp xoáy bảo quản mẫu ở -70°C
- Ống phản ứng real time và nắp đậy thể tích 0.1 ml hoặc phiến nhựa 96 giếng thể tích 0.1ml/giếng có nắp/miếng phủ riêng từng phiến.
- Đầu côn có lọc, vô trùng và không có nuclease các thể tích: 10 µl, 20 µl, 30 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Giá để tuýp
- Găng tay không bột các kích cỡ.
- Khay lạnh
- Máng
- Vật tư tiêu hao riêng cho máy tách chiết tự động
- Giấy thấm
- Văn phòng phẩm: bút, giấy
- Điều kiện bảo quản vật tư: theo hướng dẫn tại quy trình quản lý hàng hoá QL04-QĐ02.

**8.2. Trang thiết bị**

- Máy tách chiết tự động <tên máy, mã> (nếu có)
- Máy real-time PCR: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.3.08
- Máy spindown: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.3.10
- Tủ an toàn sinh học: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.3.01
- Tủ thao tác PCR: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.3.01
- Máy lắc: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.10
- Tủ lạnh: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.3.15
- Tủ lạnh âm: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.3.14.
- Micropipet các cỡ: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl: Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình NV05-VR-QT5.3.11

- Hệ thống các thiết bị văn phòng: máy tính, máy in, điều hoà, máy barcode (nếu có), phần mềm quản lý thông tin phòng xét nghiệm (nếu có) …
- Các trang thiết bị khác (bàn xét nghiệm, máy lọc nước…)
- Điều kiện bảo quản: theo hướng dẫn tại quy trình quản lý trang thiết bị tại QL04-QĐ01.

**8.2.3. Chứng chuẩn**

- Chứng dương: ARN tách chiết từ chủng SARS-CoV-2 phân lập tại PTN
- Chứng âm: nước dùng cho sinh học phân tử
- Chứng âm tách chiết: dung dịch môi trường vận chuyển vi rút và được tách chiết cùng với mẫu bệnh phẩm

**9. Kiểm soát chất lượng**

**9.1. Yếu tố ảnh hưởng**

Các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả xét nghiệm bao gồm: Các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả xét nghiệm như: lấy bệnh phẩm không đúng thời điểm hoặc không đúng kỹ thuật, sinh phẩm hoá chất còn hạn/hết hạn, thiết bị hiệu chuẩn/không hiệu chuẩn, điều kiện môi trường vượt ngưỡng yêu cầu về độ ẩm hoặc nhiệt độ, tay nghề của nhân viên phòng xét nghiệm, mức độ tuân thủ quy trình xét nghiệm.

**9.2. Kiểm soát nguyên vật liệu, trang thiết bị và điều kiện môi trường**

- Các nguyên vật liệu trước khi đưa vào sử dụng đã được kiểm tra chất lượng.
- Các tủ lạnh phải được theo dõi nhiệt độ hàng ngày và trong giới hạn cho phép.
- Các trang thiết bị được bảo dưỡng định kỳ và trong thời hạn hiệu chuẩn (nếu phù hợp).
- Điều kiện môi trường của PTN phải trong giới hạn cho phép.

**9.3. Kiểm soát mẫu bệnh phẩm**

- Loại mẫu: đảm bảo chất lượng theo yêu cầu tại quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản bệnh phẩm theo NV05-VR-QT5.4.1
- Tiêu chí loại bỏ: Theo mục 8 trong quy trình NV05-VR-QT5.4.1.

**9.4. Kiểm soát mẫu chứng**

- Chứng âm: phải cho kết quả âm tính đối với kỹ thuật realtime RT-PCR

Chứng dương (PC): Ngưỡng giá trị Ct của chứng dương

+ Gen E giá trị Ct ≤ 35

+ Gen RdRp giá trị Ct ≤ 35

+ Gen N giá trị Ct ≤ 35

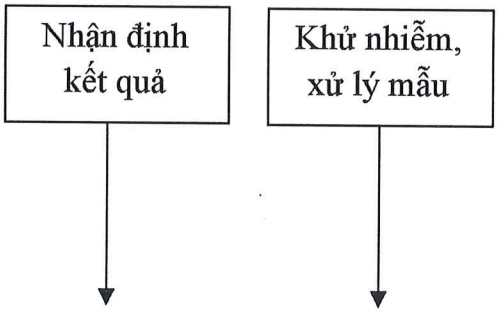
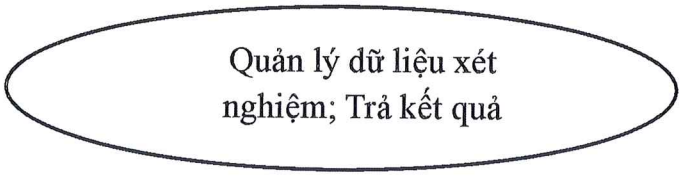
### 9.5. Chương trình ngoại kiểm

- Tham gia chương trình ngoại kiểm: Tham gia ngoại kiểm của WHO về chẩn đoán SARS-CoV-2 realtime RT-PCR (1 lần/năm)

## 10. Nội dung

### 10.1. Lưu đồ

| Bước | Trách nhiệm | Trình tự thực hiện | Tài liệu |
|---|---|---|---|
| 1 | Nhân viên PTN | Chuẩn bị mẫu và quản lý dữ liệu của mẫu | NV05-VR-QT5.4.1<br>NV05-VR-QT5.4.1-BM01 |
| 2 | Nhân viên PTN | Tách chiết vật liệu di truyền | NV05-VR-QT5.5.2<br>NV05-VR-QT5.2.02-BM01 |
| 3 | Nhân viên PTN | Thực hiện phản ứng Realtime RT-PCR | NV05-VR02-QT5.5.5<br>NV05-VR02-QT5.5.5-BM01<br>NV05-VR02-QT5.5.5-BM02 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 4 | Nhân viên PTN<br>Trưởng PTN<br>Phòng khử nhiễm/TTĐBCL |  | NV05-VR02-QT5.5.5<br>NV05-VR02-QT5.5.5-BM03<br>Quy trình QL09-QT11 |
| 5 | Nhân viên PTN |  | NV05-QT5.8.01<br>NV05-QT5.8.01-BM01 |

**10.2. Các bước thực hiện**

**10.2.1 Chuẩn bị mẫu và quản lý dữ liệu của mẫu**

- Mẫu đã được kiểm tra và tiếp nhận theo theo NV05-VR-QT5.4.1
- Lập danh sách và nhập dữ liệu/thông tin các mẫu trước khi xét nghiệm: Nhân viên PTN nhập thông tin danh sách các mẫu sẽ thực hiện xét nghiệm. Các thông tin bao gồm/theo mẫu: Phiếu yêu cầu xét nghiệm NV05-VR-QT5.4.01-BM01
- Xử lý mẫu ban đầu: thực hiện tách chiết vật liệu di truyền

**10.2.2 Tách chiết vật liệu di truyền**

- Thực hiện tại khu vực/phòng tách chiết vật liệu di truyền của phòng thí nghiệm.
- Thực hiện tách chiết vật liệu di truyền theo quy trình: NV05-VR-QT5.5.2

**10.2.3. Phản ứng Realtime RT-PCR/PCR**

10.2.3.1. Chuẩn bị mồi và probe theo nồng độ sử dụng:

- Thực hiện tại khu vực/phòng pha sinh phẩm của phòng thí nghiệm.
- Nồng độ mồi tính theo đơn vị (X) nmole (ghi trên tuýp mồi đông khô)
- Trả lại nước khử ion (X x10) µl để đạt nồng độ gốc 100 µM
- Nồng độ mồi sử dụng 10 µM được pha từ nồng độ gốc 100 µM (pha loãng 1/10)
- Chia ra các tuýp có thể tích 300 -500 µl/1 loại mồi, probe và bảo quản tại -20°C

10.2.3.2 Chuẩn bị sinh phẩm thực hiện phản ứng Realtime RT-PCR/PCR

- Thực hiện tại khu vực/phòng pha sinh phẩm của phòng thí nghiệm.

Thành phần phản ứng

***Sử dụng SuperScrip ™III Platium One-Step***

***Gen E***

| Sinh phẩm | Thể tích 1 mẫu (µl) | Số lượng phản ứng (N)<br>Với N từ 10 trở lên, N = số mẫu +10% số mẫu (làm tròn)<br>Nếu số mẫu dưới 10, N=số mẫu +1 | Thể tích cần pha |
|---|---|---|---|
| 2x Reaction Mix | 12.5 | 12.5xN | |
| MgSO4 | 0.4 | 0.4xN | |
| Mồi xuôi, 10µM (E_Sarbeco_F1) | 1 | 1.0xN | |
| Mồi ngược, 10µM (E_Sarbeco_R2) | 1 | 1.0 xN | |
| Probe, 10µM (E_Sarbeco_P1) | 0.5 | 0.5xN | |
| SSIII/Taq EnzymeMix | 1 | 1.0xN | |
| Nước cất tinh sạch | 3.6 | 3.6xN | |
| ARN mẫu | 5 | | |
| Tổng | **25** | | |

***Gene RdRp và N***

| Sinh phẩm | Thể tích 1 mẫu (µl) | Số lượng phản ứng (N)<br>Với N từ 10 trở lên, N = số mẫu +10% số mẫu (làm tròn) | Thể tích cần pha |
|---|---|---|---|
| 2x Reaction Mix | 12.5 | 12.5xN | |
| MgSO4 | 0.4 | 0.4xN | |
| Mồi xuôi, 10 µM | 1.5 | 1.5xN | |
| Mồi ngược, 10 µM | 2.0 | 2.0 xN | |
| Probe, 10 µM | 0.5 | 0.5xN | |

| | | |
|---|---|---|
| SSIII/Taq EnzymeMix | 1 | 1.0xN |
| Nước cất tinh sạch | 2.1 | 2.1xN |
| ARN mẫu | 5 | |
| **Tổng số** | **25** | |

**Mồi gen RdRp** (RdRP_SARSr-F2, RdRP_SARSr-R1, RdRP_SARSr-P2)

**Mồi gen N** (N_Sarbeco_F1, N_Sarbeco_R2, N_Sarbeco_P1)

***Chu kỳ nhiệt***

| Nhiệt độ (°C) | Thời gian | Chu kỳ lặp |
|---|---|---|
| 55 | 10:00 | |
| 94 | 03:00 | |
| 94 | 0:15 | 45 chu kỳ |
| 58 | 0:30 | |

***Sử dụng TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG***

**Gen E**

| **Sinh phẩm** | **Thể tích 1 mẫu (µl)** | **Số lượng phản ứng (N)** Với N từ 10 trở lên, N = số mẫu +10% số mẫu (làm tròn) | **Thể tích cần pha** |
|---|---|---|---|
| TaqPath master mix | 5 | 5xN | |
| Mồi xuôi, 10 µM (E_Sarbeco_F1) | 1 | 1.0xN | |
| Mồi ngược, 10 µM (E_Sarbeco_R2) | 1 | 1.0 xN | |
| Probe, 10 µM (E_Sarbeco_P1) | 0.5 | 0.5xN | |
| Nước cất tinh sạch | 7.5 | 7.5xN | |
| ARN mẫu | 5 | | |
| **Tổng số** | **20** | | |

**Gene RdRp và N**

| Sinh phẩm | Thể tích 1 mẫu (uL) | Số lượng phản ứng (N) Với N từ 10 trở lên, N = số mẫu +10% số mẫu (làm tròn) | Thể tích cần pha |
|---|---|---|---|
| TaqPath master mix | 5 | 5xN | |
| Mồi xuôi, 10 µM | 1.5 | 1.5xN | |
| Mồi ngược, 10 µM | 2.0 | 2.0 xN | |
| Probe, 10 µM | 0.5 | 0.5xN | |
| Nước cất tinh sạch | 6 | 6xN | |
| ARN mẫu | 5 | | |
| **Tổng số** | **20** | | |

**Mồi gen RdRp** (RdRP_SARSr-F2, RdRP_SARSr-R1, RdRP_SARSr-P2)

**Mồi gen N** (N_Sarbeco_F1, N_Sarbeco_R2, N_Sarbeco_P1)

***Chu kỳ nhiệt***

| Nhiệt độ (°C) | Thời gian | Chu kỳ lặp |
|---|---|---|
| 25 | 2:00 | |
| 50 | 15:00 | |
| 95 | 02:00 | |
| 95 | 0:15 | 45 chu kỳ |
| 58 | 0:30 | |

***Sử dụng QuantabioqScript® XLT One-Step RT-qPCR ToughMix***

**Gene E**

| Sinh phẩm | Thể tích 1 mẫu (µl) | Số lượng phản ứng (N) Với N từ 10 trở lên, N = số mẫu +10% số mẫu (làm tròn) | Thể tích cần pha |
|---|---|---|---|
| Quantabio mix | 10 | 5xN | |
| Mồi xuôi, 10 µM (E_Sarbeco_F1) | 1 | 1.0xN | |
| Mồi ngược, 10 µM (E_Sarbeco_R2) | 1 | 1.0 xN | |

| | | |
|---|---|---|
| Probe, 10 µM (E_Sarbeco_P1) | 0.5 | 0.5xN |
| Nước cất tinh sạch | 7.5 | 7.5xN |
| ARN mẫu | 5 | |
| **Tổng số** | **25** | |

**Gene RdRp và N**

| **Sinh phẩm** | **Thể tích 1 mẫu (uL)** | **Số lượng phản ứng (N)** Với N từ 10 trở lên, N = số mẫu +10% số mẫu (làm tròn) | **Thể tích cần pha** |
|---|---|---|---|
| TaqPath master mix | 10 | 5xN | |
| Mồi xuôi, 10 µM | 1.5 | 1.5xN | |
| Mồi ngược, 10 µM | 2.0 | 2.0 xN | |
| Probe, 10 µM | 0.5 | 0.5xN | |
| Nước cất tinh sạch | 6 | 6xN | |
| ARN mẫu | 5 | | |
| **Tổng số** | **25** | | |

**Mồi gen RdRp** (RdRP_SARSr-F2, RdRP_SARSr-R1, RdRP_SARSr-P2)

**Mồi gen N** (N_Sarbeco_F1, N_Sarbeco_R2, N_Sarbeco_P1)

***Chu kỳ nhiệt***

| **Nhiệt độ (°C)** | **Thời gian** | **Chu kỳ lặp** |
|---|---|---|
| 50 | 10:00 | |
| 95 | 01:00 | |
| 95 | 0:15 | 45 chu kỳ |
| 58 | 0:30 | |

***Sử dụng SuperScrip™III Platium One-Step và bộ mồi LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control (TilMolBiol - Đức)***

***Thành phần phản ứng***

**Gene E**

| Sinh phẩm | Thể tích 1 mẫu (µl) | Số lượng phản ứng (N)<br>Với N từ 10 trở lên, N = số mẫu +10% số mẫu (làm tròn) | Thể tích cần pha |
|---|---|---|---|
| 2x Reaction Mix | 12.5 | 12.5xN | |
| Mồi - Probe | 0.5 | 0.5xN | |
| SSIII/Taq EnzymeMix | 1 | 1.0xN | |
| Nước cất tinh sạch | 6 | 6xN | |
| ARN mẫu | 5 | | |
| **Tổng số** | **25** | | |

***Chu kỳ nhiệt***

| Nhiệt độ (°C) | Thời gian | Chu kỳ lặp |
|---|---|---|
| 55 | 3:00 | |
| 95 | 00:30 | |
| 95 | 0:03 | 45 chu kỳ |
| 60 | 0:12 | |

10.2.3.4. Tra mẫu và chạy máy

- Thực hiện tại khu vực/tủ thao tác PCR dành cho tra mẫu của phòng thí nghiệm.
- Chuẩn bị biểu mẫu kết quả xét nghiệm Realtime RT-PCR/PCR (VR5.5-QTKT02.BME01).
- Cho 5µl mẫu ARN bệnh phẩm vào tuýp chứa hỗn hợp phản ứng realtime RT-PCR, ly tâm nhanh và giữ trong giá lạnh.
- Khi tra mẫu phải nhập mã số mẫu vào sơ đồ vị trí.
- Đặt các tuýp vào máy, cài đặt/khởi động chương trình theo yêu cầu xét nghiệm.
- Tạo tên tệp và lưu giữ dữ liệu.
- Ghi chép mã thiết bị sử dụng, ngày sử dụng vào biểu mẫu.
- Theo dõi trong quá trình máy chạy, phát hiện và xử lý sự cố (nếu có).

**10.2.4. Nhận định kết quả và xử lý mẫu**

10.2.4.1 Đọc và nhận định kết quả

- Kết quả được chấp nhận khi:

+ Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang.

+ Chứng âm tách chiết: không có tín hiệu huỳnh quang.

+ Chứng dương tín hiệu huỳnh quang gen E được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 32 của phản ứng.

+ Chứng dương tín hiệu huỳnh quang gen RdRp được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 35 của phản ứng.

+ Chứng dương tín hiệu huỳnh quang gen N được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 35 của phản ứng.

Nhận định kết quả:

- Mẫu dương tính: Tín hiệu huỳnh quang được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 32 của phản ứng gene E (đường cong tuyến tính). Trong trường hợp cần thiết, cần phải có thêm kết quả gen RdRp hoặc N thì tín hiệu huỳnh quang gen E, RdRp và N thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 35 của phản ứng.
- Mẫu Âm tính: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR
- Mẫu nghi ngờ: Gen E có tín hiệu huỳnh quang được thu nhận sau chu kỳ 32 đến chu kỳ 38 của phản ứng. Mẫu bệnh phẩm sẽ được thực hiện tiếp theo với gen RdRp và/hoặc gen N.

  + Trường hợp 1 trong 2 gen dương tính, mẫu được xác định dương tính

  + Trường hợp 2 gen âm tính, mẫu sẽ được: Lặp lại từ bước tách chiết mẫu, hoặc lấy lại bệnh phẩm sau 48h kể từ lần lấy mẫu trước.

10.2.4.2. Khử nhiễm và xử lý mẫu

10.2.4.2.1 Khử nhiễm sau xét nghiệm

- Khử nhiễm tại PTN:
  + Khu vực làm việc: QL07-QT05
  + Trang thiết bị: QL04-QT01
  + Mẫu bệnh phẩm: <tuỳ theo từng PTN>
- Xử lý rác thải: Xem hướng dẫn phân loại và xử lý chất thải mục 8.3 (STAT) và quy trình "Thu gom và xử lý chất thải lây nhiễm" (mã số: QL09-QT11).

10.2.4.2.2.Lưu giữ, bảo quản mẫu

- Mẫu bệnh phẩm sau khi xét nghiệm sẽ được lưu giữ tại PTN - Viện VSDTTƯ.

- Xem quy trình lưu giữ mẫu sau xét nghiệm NV05-QT5.7.01.

| Mẫu | Điều kiện | Thời gian lưu (sau khi trả kết quả) |
|---|---|---|
| Bệnh phẩm dương tính | -70°C | 10 năm |
| Bệnh phẩm âm tính | 4°C | 7 ngày |
| Mẫu sau tách chiết | -20°C hoặc -80°C | 3 tháng |

10.2.4.2.3. Huỷ mẫu

- Mẫu bệnh phẩm hết thời gian bảo quản hoặc không dùng trong xét nghiệm sẽ được hủy theo tiêu chuẩn an toàn sinh học của luật sở tại (trong nước/nội bộ) và theo hệ thống quản lý chất lượng.
- Xem quy trình tiêu hủy bệnh phẩm NV05-QT5.7.02.

### 10.2.5. Quản lý dữ liệu và trả kết quả

- In bản trả lời kết quả
- Xuất dữ liệu
- Nhập dữ liệu vào hệ thống thông tin PTN
- Trả kết quả xét nghiệm

## 11. Phụ lục và biểu mẫu

| STT | Tên phụ lục, biểu mẫu | Mã số |
|---|---|---|
| 1 | Biểu mẫu pha mồi realtime RT-PCR SARS-CoV-2 | NV05-VR02-QT5.5.5-BM01 |
| 2 | Biểu mẫu pha sinh phẩm realtime RT-PCR SARS-CoV-2 | NV05-VR02-QT5.5.5-BM02 |
| 3 | Biểu mẫu kết quả xét nghiệm realtime RT-PCR SARS-CoV-2 | NV05-VR02-QT5.5.5-BM03 |
| 4 | Biểu mẫu tách chiết ARN từ mẫu bệnh phẩm | NV05-VR-QT5.2.02-BM01 |
| 5 | Biểu mẫu trả lời kết quả xét nghiệm | NV05-QT5.8.01-BM01 |

## 12. Hồ sơ

| STT | Tên hồ sơ | Đơn vị lưu trữ | Hình thức lưu | Thời gian lưu |
|---|---|---|---|---|

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Hồ sơ phiếu yêu cầu xét nghiệm | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| | | | Điện tử | 10 năm |
| 2 | Hồ sơ xét nghiệm | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| | | | Điện tử | 10 năm |
| 3 | Hồ sơ phiếu trả kết quả xét nghiệm | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| | | | Điện tử | 10 năm |
| 4 | Hồ sơ theo dõi trả kết quả xét nghiệm | PTN ZVP | Văn bản/điện tử | 5 năm |
| 5 | Sổ theo dõi bệnh nhân | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| | | | Điện tử | 10 năm |

## 13. Tài liệu tham khảo

1. World Health Organization. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR (Berlin Jan 13th, 2020).
2. World Health Organization. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR (Berlin, Jan 17th, 2020).
3. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19 (Interim guidance).

| | | |
|---|---|---|
| | VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG<br>**KHOA VIRUS** | *Mã số:* **QTKT-VRCM-05.03-03**<br>*Phiên bản:* ***1.1***<br>*Ngày ban hành:* ***30/03/2020***<br>*Số trang:* ***09*** |
| | **QUY TRÌNH PHÂN LẬP SARS-COV-2 TRÊN TẾ BÀO** | |

| | Họ tên | Ký tên | Ngày |
|---|---|---|---|
| **Biên soạn** | Lê Thị Thanh | | 09/03/2020 |
| **Xem xét** | Nguyễn Lê Khánh Hằng | | 16/03/2020 |
| **Phê duyệt** | Lê Thị Quỳnh Mai | | 23/03/2020 |

## 1. MỤC ĐÍCH

SARS-CoV-2 phân lập được phục vụ cho các nghiên cứu về đặc điểm virus học, sự tiến hoá của virus, đánh giá sinh phẩm chẩn đoán, phát triển thuốc kháng virus và sản xuất vaccine.

## 2. PHẠM VI ÁP DỤNG

Quy trình xét nghiệm này được áp dụng tại các đơn vị có PTN ATSH cấp độ 3

## 3. NGUYÊN LÝ

Mẫu bệnh phẩm đường hô hấp trên và đường hô hấp dưới (dịch họng, dịch tỵ hầu, dịch mũi, dịch nội khí quản…) đã được xác định dương tính với SARS-CoV-2 bằng phương pháp Realtime RT-PCR được gây nhiễm trên tế bào Vero E6. Quá trình nhân lên của virus được theo dõi thông qua sự thay đổi hình dạng tế bào (hiện tượng gây huỷ hoại tế bào - CPE). Virus phân lập được khẳng định bằng phương Realtime RT-PCR và phương pháp Tạo đám hoại tử (Plaque assay)

## 4. TRÁCH NHIỆM

-Trưởng PTN và nhân viên xét nghiệm tuân thủ quy trình này

## 5. ĐỊNH NGHĨA VÀ CÁC TỪ VIẾT TẮT

- Vero E6: tế bào thận khỉ xanh châu Phi dòng E6
- CPE (Cytopathic effect): Huỷ hoại tế bào
- PTN/PXN: Phòng thí nghiệm/phòng xét nghiệm

## 6. AN TOÀN

- Tham khảo mục "An toàn" trong các quy trình QTKT-VRCM-05.05.02, QTKT-VRCM-05.05.03, QTKT-VRCM-05.05.04.
- Phân lập SARS-CoV-2 yêu cầu phải tiến hành thí nghiệm trong phòng thí nghiệm An toàn sinh học cấp 3 (ATSH cấp 3) theo khuyến cáo của TCYTTG ngày 12/02/2020:

+ Nhân viên PTN phải được đào tạo

+ Trang phục bảo hộ khi thực hành xét nghiệm phải được tuân thủ: quần áo, găng tay 2 lớp, khẩu trang N95….

## 7. KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

### *7.1. Yếu tố ảnh hưởng*

- Các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả xét nghiệm như: lấy mẫu bệnh phẩm, chuẩn bị bệnh phẩm, thuốc thử, hiệu chuẩn thiết bị, điều kiện môi trường, tay nghề của nhân viên …
- Nhằm hạn chế và nâng cao chất lượng xét nghiệm, các thủ tục và quy trình đều được hướng dẫn trực tiếp cho nhân viên xét nghiệm đồng thời hóa chất thuốc thử đều được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất và vẫn còn hạn sử dụng.

### *7.2. Kiểm soát nguyên vật liệu và trang thiết bị*

- Nguyên vật liệu và trang thiết bị đóng vai trò quan trọng trong công tác xét nghiệm, vì vậy vật liệu và thiết bị sử dụng trong xét nghiệm phải được bảo quản tối ưu theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Các tủ $2^0$C- $8^0$C hoặc tủ -$20^0$C chứa hóa chất, sinh phẩm phải được theo dõi hàng ngày; trang thiết bị phải được đảm bảo điều kiện độ ẩm thoáng khí, nhiệt độ <$30^0$C và độ ẩm <90%.

### *7.3. Kiểm soát mẫu bệnh phẩm*

- Loại mẫu: dịch tỵ hầu, dịch họng, dịch mũi, dịch nội khí quản theo yêu cầu tại quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 (VR-5.4-QTKT.01)
- Tiêu chí loại bỏ: không đạt yêu cầu về thu thập, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm theo quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 (VR-5.4-QTKT.01)

### *7.4. Kiểm soát mẫu chứng*

- Chứng tế bào: không có hiện tượng CPE trong suốt quá trình nuôi cấy.

## 8. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ

### *8.1. Điều kiện bảo quản*

#### *8.1.1. Hóa chất và sinh phẩm*

- Hóa chất sinh phẩm sử dụng phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm
- Khi sử dụng sinh phẩm cho pha chế, phải luôn được giữ lạnh và cất lại ngay sau khi dùng xong.

*8.1.2. Dụng cụ tiêu hao và trang thiết bị*

- Dụng cụ tiêu hao trong phòng thí nghiệm được bảo quản luôn thông thoáng. Khi sử dụng sẽ được ghi chép thông tin trong biểu mẫu phiếu theo dõi vật tư.
- Trang thiết bị trong phòng thí nghiệm được bảo quản và vận hành trong khoảng nhiệt độ từ 25±5$^0$C, độ ẩm từ 45-90%.

***8.2. Hóa chất và sinh phẩm***

+ Tế bào Vero E6 – Viện Quốc gia các Bệnh truyền nhiễm Nhật Bản (NIID)

+ Mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính với SARS-CoV-2 bằng phương pháp Realtime RT-PCR, Viện VSDTTW

+ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) high glucose, Gibco, 500ml-**(11965092)**

+ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) high glucose, Gibco, 1x10L **(12100-061)**

+ Fetal Bovine Serum, Gibco, 500ml **(16140071)**

+ 0.25% Trypsin-EDTA solution, Gibco, 100ml **(25200056)**

+ Dulbeco Phosphate Buffered Saline (PBS), Gibco, 500ml **(14190)**

+ 7.5% Sodium Carbonate Solution ($NaHCO_3$), Gibco, 100ml **(25080)**

+ L-Glutamine-200mM, Gibco, 20ml **(25030-081)**

+ CellBanker® , Juji Field Inc, 100ml **(BLC-1)**

***8.3. Dụng cụ tiêu hao và trang thiết bị***

| **Thiết bị - Dụng cụ** | **Hãng sản xuất** | **Mã số** |
|---|---|---|
| Tủ an toàn sinh học cấp II | Airtech | BHC1305 IIA |
| Tủ ấm, 37°C, 5% $CO_2$ | CellXpert C170i | Eppendorf |
| Kính hiển vi soi ngược | Leica | DMi1 & MC120 |
| Máy ly tâm cho tuýp 15ml, 50ml, phiến 96 giếng | EFENDORF | Centrifuge 5810R |
| Máy ly tâm cho tuýp 1.7ml | Beckman Counter | |
| Pi-pet đơn kênh 10ul, 50ul, 100ul, 200ul, 1000ul | Gilson | Piston |
| Pi-pet đa kênh: 5-50ul, 30-300ul | Thermo | Piston |
| Chai nuôi tế bào 25 $cm^2$ | Corning | 430168 |
| Chai nuôi tế bào 75$cm^2$ | Corning | 430641 |
| Tube ly tâm 1.5 ml | Corning | 430791 |
| Tube 2ml | Corning | 430659 |

## 9. QUY TRÌNH PHÂN LẬP SARS-COV-2

**9.1. Chuẩn bị môi trường và dung dịch:**

**- Môi trường phát triển tế bào và môi trường nuôi cấy virus**

| TT | Thành phần | DMEM 10% FBS (MT duy trì tế bào) | DMEM 2% FBS (MT nuôi cấy) |
|---|---|---|---|
| 1 | DMEM x10 | 100 ml | 100 ml |
| 2 | FBS | 100 ml | 20 ml |
| 3 | Penicilin-Streptomycin (100 U/ml Pen - 100µg/ml Strep) | 10 ml | 10ml |
| 4 | $NaHCO_3$ 7.5 % | 30 ml | 30 ml |
| 5 | Hepes 1M | 10 ml | 10ml |
| 6 | Nước cất 2 lần tiệt trùng | Điều chỉnh thể tích đến 1000ml | |

- MT duy trì tế bào (DMEM 10% FBS): pH 7.0-7.2
- MT nuôi cấy (DMEM 2% FBS): pH 7.2-7.4

**- Dung dịch đệm PBS**

Hòa tan các thành phần sau trong 800ml trong nước cất ($H_2O$):

- 8.00 g sodium chloride (NaCl)
- 0.20 g potassium chloride (KCl)
- 1.15 g sodium phosphate, dibasic, andydrous ($Na_2HPO_4$)
- 0.21 g potassium phosphate, monobasic, andydrous ($KH_2PO_4$)

Chỉnh pH = 7.2 bằng HCl, đổ thêm nước cất thành 1L; tiệt trùng bằng autoclave.

**9.2. Chuẩn bị chai tế bào**

1. Kiểm tra tế bào Vero-E6 1 lớp (phủ kín 70%-95% diện tích bề mặt chai nuôi tế bào). Thông thường, 1 chai nuôi tế bào diện tích 75$cm^2$ có nông độ (~2 x 107 tế bào/chai).
2. Rửa tế bào bằng 5ml dung dịch trypsin-EDTA rồi loại bỏ.
3. Thêm 5 ml trypsin-EDTA để trypsin-EDTA phủ kín 1 lớp tế bào.
4. Ủ chai tế bào ở 37oC, 5% CO2 đến khi tế bào tách rời nhau (3-10 phút)
5. Thêm 5-10 ml môi trường vào mỗi chai tế bào.
6. Rửa tế bào 2 lần bằng môi trường pha loãng vi rút
   - Dùng pipet trộn nhẹ để tế bào tách rời nhau
   - Chuyển hỗn dịch tế bào vào tuýp 50ml, đổ đầy môi trường pha loãng vi rút vào tuýp

- Ly tâm 1000 vòng trong 10 phút để loại bỏ nước nổi, thu cặn tế bào.
- Lặp lại các bước trên

7. Hòa tan cặn tế bào trong môi trường pha loãng, đếm tế bào bằng buồng đếm.
8. Pha loãng tế bào tới nồng độ $1.0 \times 10^5 - 1.5 \times 10^5$ tế bào/ml
9. Chuẩn bị tế bào trên chai $25cm^2$: nhỏ 6 ml hỗn dịch tế bào đã được pha loãng $1.0 \times 10^5 - 1.5 \times 10^5$ tế bào/ml vào chai.
10. Ủ chai ở điều kiện 37°C, 5% $CO_2$ trong 2 ngày để tế bào đạt mật độ 70% – 90%.

### 9.3. Gây nhiễm

*Phân lập virus SARS-CoV-2 yêu cầu phải tiến hành thí nghiệm trong phòng thí nghiệm An toàn sinh học cấp 3 (ATSH cấp 3) theo khuyến cáo của TCYTTG*

**- Xử lý mẫu bệnh phẩm lâm sàng:**

+ Trộn đều mẫu bệnh phẩm bằng máy vortex. Loại bỏ tăm bông ngoáy họng/tỵ hầu.

+ Thêm 20 µl kháng sinh xử lý bệnh phẩm (Kanamycin sulfate 250ug/ml và Cipro-HCl 10mg/ml).

+ Để tại nhiệt độ phòng 30-45 phút. Sử dụng mẫu để phân lập.

**- Gây nhiễm mẫu vào tế bào:**

+ Loại bỏ môi trường nuôi cấy trong các giếng

+ Thêm 500 µl mẫu bệnh phẩm

+ Ủ 37°C/ 5% CO2/1 giờ

+ Thêm 5 – 6 ml môi trường DMEM 2% FBS

+ Ủ $37^0$C/5% CO2, trong vòng 7 ngày

**- Theo dõi hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE)**

+ Mẫu bệnh phẩm có xuất hiện CPE sẽ được kiểm tra bằng Realtime RT-PCR và phản ứng tạo đám hoại tử (Plaque)

+ Mẫu bệnh phẩm không xuất hiện CPE sau 7 ngày, sẽ được cấy chuyển lần 2, lần 3 trên chai $25cm^3$, mỗi lần 7 ngày.

**-Nhận định kết quả:**

+ Mẫu âm tính (không thu chủng): sau 3 lần cấy chuyển không xuất hiện CPE và kiểm tra sự có mặt của SARS-CoV-2 bằng Realtime RT-PCR với giá trị Ct > 20

+ Mẫu dương tính (chủng virus): có xuất hiện CPE, Realtime RT-PCR có Ct<14-15 và có hiệu giá virus khi thực hiện phản ứng tạo đám hoại tử (Plaque).

### 9.4. Khuếch đại và thu hỗn dịch virus

+ Các chủng virus thu hoạch được tiến hành khuếch đại trên chai tế bào Vero E6 mọc 75 $cm^2$ mọc đẹp 1 lớp

+ Lựa chọn các chai tế bào xuất hiện CPE từ 72 đến 96 giờ sau khi gây nhiễm

+ Kiểm tra chủng Realtime RT-PCR có Ct<14-15 và có hiệu giá virus khi thực hiện phản ứng tạo đám hoại tử (Plaque)

+ Chủng virus được chia vào các tuýp 2.0ml, mỗi tuýp 1 – 1,5 ml.

+ Bảo quản -80°C

### 9.5. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu Phân lập SARS-CoV-2
- Kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo Trưởng phòng thí nghiệm.

## 10. XỬ LÍ MẪU, DỤNG CỤ, CHẤT THẢI

Tham khảo mục "Xử lý mẫu, dụng cụ, chất thải" trong quy trình QTKT-VRCM-05.05.02 của phòng thí nghiệm Cúm – Khoa Virus – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

## 11. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Roman Wölfel, Victor M. Corman, Wolfgang Guggemos, Michael Seilmaier, Sabine Zange, Marcel A. Müller, Daniela Niemeyer, Terry C. Jones, Patrick Vollmar, Camilla Rothe, Michael Hoelscher, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Julia Schneider, Rosina Ehmann, Katrin Zwirglmaier, Christian Drosten, Clemens Wendtne. *Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019*, Nature (2020), 581, 465–469.
2. Jennifer Harcourt, Azaibi Tamin[1], Xiaoyan Lu, Shifaq Kamili, Senthil K. Sakthivel. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States*. Emerging Infectious Diseases, 26, (6)—June 2020
3. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. *Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39(6):1059-1061. doi:10.1007/s10096-020-03913-9
4. WHO. Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-

nCoV). Interim guidance, 12 February 2020.

## 12. PHỤ LỤC

Biểu mẫu 1. Pha môi trường

Biểu mẫu 2. Phân lập SARS-CoV-2

# Biểu mẫu 1. PHA MÔI TRƯỜNG

Người thực hiện: ..... Ngày thực hiện: …. / …. /…

Người kiểm tra: .....

## A. Hoá chất, sinh phẩm

| Hóa chất/Sinh phẩm | Số lô | Hạn sử dụng |
|---|---|---|
| DMEM | | |
| FBS | | |
| CMC | | |
| Tế bào _____ | | |
| Virus_____ | | |

## B. Pha môi trường

| TT | Thành phần | DMEM 10% FBS (MT duy trì tế bào) | DMEM 2% FBS (MT nuôi cấy) |
|---|---|---|---|
| 1 | DMEM x10 | | |
| 2 | FBS | | |
| 3 | Penicilin-Streptomycin (100 U/ml Pen - 100µg/ml Strep) | | |
| 4 | $NaHCO_3$ 7.5 % | | |
| 5 | Hepes 1M | | |
| 6 | Nước cất 2 lần tiệt trùng | | |

# Biểu mẫu 2. PHÂN LẬP SARS-COV-2

Người thực hiện: .....  Ngày thực hiện: …. / …. /…

Người kiểm tra: .....

Dòng tế bào :……..

| STT | Mã BF | Lần cấy | Realtime RT-PCR | Thời gian phân lập | | | | Ghi chú |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 48h | 72h | 96h | 7 ngày | |
| 1 | | P1 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P2 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P3 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| 2 | | P1 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P2 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P3 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| 3 | | P1 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P2 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P3 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| 4 | | P1 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P2 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | P3 | E gene | | | | | |
| | | | RdRp gene | | | | | |
| | | | | | | | | |

| | VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG | Mã số: *NV05-VR02-QT5.5.05*<br>Lần ban hành: *01*<br>Ngày hiệu lực: ***30/ 01 /2020***<br>Tổng số trang: |
|---|---|---|
| | **QUY TRÌNH**<br>**PHÂN LẬP nCoV TRÊN TẾ BÀO** | |

| | **Họ tên** | **Ký tên** | **Ngày** |
|---|---|---|---|
| **Biên soạn/ Sửa đổi** | Ứng Thị Hồng Trang | | 30/01/2020 |
| | Lê Thị Thanh | | 30/01/2020 |
| **Xem xét** | Nguyễn Lê Khánh Hằng | | 30/01/2020 |
| **Phê duyệt** | Hoàng Vũ Mai Phương | | 30/01/2020 |

## THEO DÕI LỊCH SỬ TÀI LIỆU

| **Lần ban hành** | **Ngày hiệu lực** | **Nội dung sửa đổi** | **Vị trí sửa đổi** |
|---|---|---|---|
| 1.1 | 30/01/2020 | Ban hành lần đầu | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

## 1. Mục đích

Thu thập chủng virut hô hấp, phục vụ cho các nghiên cứu khác như xác định đặc tính kháng nguyên, nghiên cứu sự tiến hoá của virut.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc phân lập chủng nCoV trong mẫu bệnh phẩm đường hô hấp trên và đường hô hấp dưới (dịch họng, dịch tỵ hầu, dịch mũi, dịch nội khí quản…) đã được xác định dương tính với nCoV bằng phương pháp realtime RT-PCR.

## 3. Trách nhiệm

### 3.1. Trưởng phòng xét nghiệm

- Duyệt các quy trình liên quan đến phân lập nCoV

### 3.2. Cán bộ quản lý chất lượng

- Duyệt các dữ liệu kiểm soát chất lượng định kỳ
- Kiểm duyệt và cập nhật quy trình

### 3.3. Xét nghiệm viên

- Đảm bảo bệnh phẩm được dán nhãn đúng và được ghi lại vào sổ.
- Kiểm tra thiết bị trước khi sử dụng
- Thực hiện xét nghiệm
- Hoàn tất báo cáo về xét nghiệm

## 4. Định nghĩa và từ viết tắt

- Vero E6: tế bào thận khỉ xanh châu Phi dòng E6
- CPE: huỷ hoại tế bào
- PXN: phòng xét nghiệm

## 5. Nguyên lý

Chủng mới của vi rút Corona (nCoV) là vi rút thuộc họ Coronaviridae, nhóm betacoronavirus, khác nhánh với các betacoronavirus liên quan là vi rút SARS và MERS-CoV. Với đặc tính của coronavirus, nCoV có thể nhân lên trên dòng tế bào Vero E6. Sự nhân lên và phát triển của vi rút trên tế bào Vero E6 có thể nhận biết được thông qua sự thay đổi hình dạng tế bào (sự huỷ hoại tế bào – CPE), quan sát bằng kính hiển vi lộn ngược. Sự hiện diện của vi rút có thể được kiểm chứng bằng kính hiển vi

điện tử truyền qua (TEM) và/hoặc phản ứng realtime RT-PCR xác định vật liệu di truyền.

**6. An toàn**

**6.1. An toàn chung cho PXN**

- An toàn chung cho khu vực xét nghiệm bao gồm an toàn điện, cháy, nổ…

+ Xem hướng dẫn an toàn điện mục 10.1 (STAT)

+ Xem hướng dẫn an toàn cháy nổ mục 10.2 (STAT)

- Các biện pháp an toàn phải được tuân thủ nghiêm ngặt từ quá trình chuẩn bị hóa chất, pha hóa chất và chia hóa chất.

+ Xem hướng dẫn trang bị bảo hộ cá nhân mục 5.1 (STAT)

+ Xem hướng dẫn phân loại và xử lý chất thải mục 8.3 (STAT)

+ Xem hướng dẫn vệ sinh và khử nhiễm phòng thí nghiệm mục 8.4 (STAT)

- Các thiết bị hoặc trang phục bảo hộ phải được sử dụng trong quá trình xét nghiệm.

+ Xem hướng dẫn thực hành an toàn mục 8.2 (STAT)

**6.2. Chất thải sau xét nghiệm**

- Xử lý chất thải nguy cơ lây nhiễm

+ Xem hướng dẫn phân loại và xử lý chất thải mục 8.3 (STAT)

**6.3.Xử lý sự cố**

+ Xem hướng dẫn sự cố an toàn mục 8.4 (STAT)

**7. Đặc trưng kỹ thuật**

Phương pháp phân lập vi rút SARS-CoV-2 trên tế bào Vero E6 là phương pháp sử dụng tế bào cảm nhiễm với họ Corona để vi rút có thể phát triển được. Từ đó, thu thập được chủng SARS-CoV-2 với đầy đủ đặc tính kháng nguyên và di truyền học.

**8. Nguyên vật liệu và trang thiết bị**

**8.1 Nguyên vật liệu**

- Tế bào Vero E6 một lớp đã được chuẩn bị trước đó 2 ngày (48 giờ): chai 25 $cm^2$/75$cm^2$ (xem quy trình (NV05-VR03-QT5.5.04)

- Môi trường phát triển tế bào (xem quy trình (NV05-VR03-QT5.5.04)

**8.2 Trang thiết bị**

- Tủ lạnh 4 °C
- Tủ âm -80°C
- Tủ ấm (33°C - 37°C) có 5% $CO_2$
- Kính hiển vi lộn ngược
- Máy vortex
- Pipet đơn
- Đầu côn có lọc 200ul, 1000ul
- Tuýp chứa mẫu 2.0ml
- Tủ an toàn sinh học cấp độ II
- Phòng an toàn sinh học cấp III

## 9. Kiểm soát chất lượng

### 9.1. Yếu tố ảnh hưởng

- Các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả xét nghiệm như: lấy bệnh phẩm, chuẩn bị bệnh phẩm, thuốc thử, hiệu chuẩn thiết bị, điều kiện môi trường, tay nghề của nhân viên …
- Nhằm hạn chế và nâng cao chất lượng xét nghiệm, các thủ tục và quy trình đều được hướng dẫn trực tiếp cho nhân viên xét nghiệm, đồng thời, sinh phẩm - hóa chất thuốc thử đều được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất và vẫn còn hạn sử dụng.

### 9.2. Kiểm soát nguyên vật liệu và trang thiết bị

- Nguyên vật liệu và trang thiết bị đóng vai trò quan trọng trong công tác xét nghiệm, vì vậy vật liệu và thiết bị sử dụng trong xét nghiệm phải được bảo quản tối ưu theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Các tủ $4^0$C hoặc tủ -$20^0$C chứa hóa chất, sinh phẩm phải được theo dõi hàng ngày; trang thiết bị phải được đảm bảo điều kiện độ ẩm thoáng khí, nhiệt độ <$31^0$C và độ ẩm <95%.

### 9.3. Kiểm soát mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: dịch tị hầu, dịch họng, dịch mũi, dịch nội khí quản theo yêu cầu tại quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản bệnh phẩm nghi nhiễm nCoV (VR-5.4-QTKT.01)
- Tiêu chí loại bỏ: không đạt yêu cầu về thu thập, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm theo quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản bệnh phẩm nghi nhiễm nCoV (VR-5.4-

QTKT.01)

**9.4. Kiểm soát mẫu chứng**

- Chứng âm tế bào: không có hiện tượng CPE trong suốt quá trình nuôi cấy.

**9.5. Chương trình ngoại kiểm**

Tham gia chương trình ngoại kiểm của tổ chức Y tế thế giới (WHO)

**6. Nội dung**

**a. Chuẩn bị môi trường phát triển tế bào để phân lập virut**

- Pha môi trường DMEM có FBS: bảng dưới

| TT | Thành phần | 10% FBS | Nồng độ cuối |
|---|---|---|---|
| 1 | DMEM x10 lần | 100 ml | |
| 2 | Heat inactivated Fetal Bovine Serum | 100 ml | |
| 3 | Penicilin-Streptomycin (Pen-Strep) | 10 ml | 100 U/ml Pen<br>100µg/ml Strep |
| 4 | Sodium Bicarbonate 7.5 % | 30 ml | |
| 5 | HEPES | 10 ml | |
| 6 | Nước cất 2 lần tiệt trùng | Điều chỉnh thể tích đến 1000ml | |

- Cho từng loại dung dịch theo thứ tự
- Lắc đều cho dung dịch đồng nhất
- Đo pH môi trường

**b. Phân lập vi rút**

***Tất cả các bước phân lập nCoV phải được thực hiện trong phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp độ III.***

**10.2.1. Chuẩn bị tế bào**

Sử dụng chai 25 $cm^2$ để phân lập virut.

- Tế bào dùng để phân lập được chuẩn bị (tách) trước đó 2 ngày để thu được lớp tế bào có độ che phủ 80 – 100%. Xem quy trình nuôi cấy, cất giữ và phục hồi tế bào (NV05-VR03-QT5.5.04)

- Kiểm tra tế bào trước khi phân lập bằng kính hiển vi ở độ phóng đại 40.

- Loại bỏ môi trường phát triển trong tuýp / chai nuôi, rồi rửa lớp tế bào bằng dung dịch PBS (2 lần) và môi trường duy trì tế bào D-MEM (1 lần).

**10.2.2. Cấy vi-rút**

*Tại NIC – NIHE, đối với quá trình phân lập nCoV từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng, chai 25cm$^2$ được sử dụng ở lần cấy thứ 1 và với những mẫu không có CPE ở lần cấy thứ 2 và thứ 3. Chai 75 cm$^2$ được sử dụng để cấy những mẫu có CPE nhằm thu được hỗn dịch chứa virut với thể tích lớn hơn.*

- Loại bỏ môi trường trong tuýp tế bào

- Cấy mỗi mẫu bệnh phẩm vào một chai 25 cm$^2$: 200 – 250 µl / chai

- Ủ ở 33 °C trong 30 – 60 phút.

- Thêm môi trường duy trì tế bào D-MEM 5 – 6 ml / chai.

- Ủ trong tủ ấm ở điều kiện 35°C và theo dõi hiện tượng CPE hàng ngày (trong 7 ngày).

- Đối với các mẫu có CPE. mẫu bệnh phẩm sẽ được cấy chuyển, được khuếch đại để thu được lượng hỗn dịch chứa virut với thể tích lớn hơn.

**10.2.3. Cấy chuyển**

- Mẫu phân lập sẽ được cấy chuyển nếu ở lần cấy thứ 1 và thứ 2 không có CPE

- Ở lần cấy thứ 3, tất cả các mẫu được kiểm tra sự có mặt của virut bằng phản ứng realtime RT-PCR.

- Các bước khi cấy chuyển cũng tương tự như cấy lần 1, trong đó, môi trường trong tuýp nuôi cấy sẽ được cấy sang tuýp nuôi cấy mới.

**10.2.4. Khuếch đại virut**

- Các mẫu có CPE sẽ được khuếch đại virut trong chai 75cm$^2$.

- Các bước thực hiện tương tự như cấy chuyển

**10.2.5. Thu hoạch hỗn dịch nuôi cấy virut**

Thu hoạch hỗn dịch nuôi cấy virut khi tuýp / chai nuôi cấy có mức độ CPE 80-90%.

- Thu hỗn dịch nuôi cấy virut, chia vào các tuýp 2.0ml, mỗi tuýp 1 – 1,5 ml.

- Kiểm tra sự có mặt của nCoV bằng phản ứng realtime RT-PCR, IFA

- Kiểm tra hình thái vi rút bằng kính hiển vi điện tử

- Cách đánh mã cho các chủng virut phân lập:

Mã bệnh phẩm / Mã virut

Tế bào sử dụng khi phân lập - Số lần cấy

Ngày thu hoạch

Ví dụ, nếu mẫu bệnh phẩm có mã số là VR-03/01/01/01 được phân lập trên tế bào Vero E6, thu hoạch ở lần cấy thứ 2 ngày 15/2/2020 thì ghi nhãn như sau:

VR-03/01/01/01

Vero E6 – 2

**7. Kết quả và biện luận**

Kết quả được chấp nhận khi:

- Chứng âm tế bào: không có hiện tượng CPE trong suốt quá trình nuôi cấy.

- Mẫu dương tính phân lập: có hiện tượng CPE trong vòng 7 ngày, kiểm tra bằng phương pháp realtime RT-PCR dương tính với nCoV (gen E, RdRp và N), có giá trị Ct ≤ 20, IFA dương tính.

**8. Xử lý mẫu, dụng cụ, chất thải**

Xem hướng dẫn phân loại và xử lý chất thải mục 8.3 (STAT)

**9. Phụ lục và biểu mẫu**

| STT | Tên phụ lục, biểu mẫu | Mã số |
|---|---|---|
| 1 | Biểu mẫu theo dõi kết quả phân lập | |
| | | |
| | | |

**14. Hồ sơ**

| STT | Tên hồ sơ | Đơn vị lưu trữ | Hình thức lưu | Thời gian lưu |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Sổ theo dõi phân lập | PTN ZVP | Có thời hạn | 5 năm |
| 2 | Sổ lưu chủng vi rút | PTN ZVP | Có thời hạn | 5 năm |
| | | | | |

## 10. Tài liệu tham khảo

1. M.-L. Ng, S.-H. Tan, E.-E. See, E.-E. Ooi,A.-E. Ling 2003, Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. Journal of General Virology, 84, 3291–3303
2. Thomas G. Ksiazek, Dean Erdman, Cynthia S. Goldsmith et. al 2003, A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med 348:1953-1966
3. Matthew Kaye, Julian Druce, Thomas Tran et. al 2006, SARS–associated Coronavirus Replication in Cell Lines. Emerging Infectiuos Diseases 12, 128-133
4. Tài liệu hội thảo chuyên đề về thẩm định và xác nhận phương pháp, Trường đại học Sydney, Úc, 2011.

| | | |
|---|---|---|
| | **VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**<br>**QUY TRÌNH CHI TIẾT NHÓM KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN THẾ HỆ MỚI ILLUMINA CHO VI RÚT SARS-COV-2** | Mã số: *NV05-VR02-QT5.5.7*<br>Lần ban hành: *1.1*<br>Ngày hiệu lực: ***20 /5 /2020***<br>Tổng số trang: |

| | Họ tên | Ký tên | Ngày |
|---|---|---|---|
| **Biên soạn/ Sửa đổi** | Ứng Thị Hồng Trang | | 15 / 4 / 2020 |
| **Xem xét** | Nguyễn Vũ Sơn | | 3 / 5 / 2020 |
| | Hoàng Vũ Mai Phương | | 3 / 5 / 2020 |
| **Phê duyệt** | Lê Thị Quỳnh Mai | | 10 / 5 / 2020 |

**THEO DÕI LỊCH SỬ TÀI LIỆU**

| Ngày hiệu lực | Lần ban hành | Nội dung sửa đổi | Vị trí sửa đổi |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

## 1. Mục đích

Quy trình nhóm kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới Illumina được thực hiện để xác định trình tự gen của vi rút SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng/chủng nhằm xác định đặc tính di truyền của vi rút SARS-CoV-2

## 2. Phạm vi áp dụng

- Loại mẫu/chủng: bệnh phẩm hô hấp, dung dịch nuôi cấy virus.
- Đơn vị áp dụng: PTN Cúm, Khoa virus, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
- Được áp dụng trong giám sát bệnh/chẩn đoán PTN/nghiên cứu tại PTN và được thẩm định phương pháp (nếu cần).

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên PTN chịu trách nhiệm tuân thủ quy trình xét nghiệm và quy định ATSH.
- Cán bộ phụ trách ATSH giám sát việc tuân thủ quy định ATSH.
- Trưởng PTN và cán bộ QLCL giám sát nhằm đảm bảo việc tuân thủ quy trình.
- Trưởng PTN và cán bộ QLKT chịu trách nhiệm về quy trình kỹ thuật.
- Trưởng PTN và QLCL/QLKT chịu trách nhiệm về chất lượng của kết quả xét nghiệm.

## 4. Định nghĩa và từ viết tắt

| | |
|---|---|
| DNA | : deoxyribonucleic axit |
| RNA | : ribonucleic axit |
| ATSH | : An toàn sinh học |
| cDNA | : Complementary DNA (ADN bổ sung) |
| GTTG | : giải trình tự gen |
| Kb | : Kilo base |
| NEC | : chứng âm tách chiết |
| NTC | : chứng âm phản ứng |
| NGS | : Next Generation Sequencing |
| PCR | : phản ứng chuỗi polymerase |
| PTN | : Phòng thí nghiệm |
| QLKT | : Quản lý kỹ thuật |
| QLCL | : Quản lý chất lượng |
| VSDTTƯ | : Vệ sinh dịch tễ Trung ương |

## 5. Nguyên lý

Công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới Illumina là hệ thống xác định trình tự gen thực hiện dựa trên nguyên lý sinh tổng hợp trên cả 2 sợi DNA được gắn bản (flowcell), không sử dụng mồi đặc hiệu. Tín hiệu phát quang được thu thập dưới dạng chụp ảnh. Các nucleotide sau đó được sắp xếp và ghép đoạn theo phần mềm phân tích dữ liệu của hệ thống Illumina.

Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (Next-generation sequencing – NGS) là công nghệ giải trình tự song song hỗn hợp. Về nguyên lý, kỹ thuật Illumina NGS tương tự kỹ thuật giải trình tự Sanger (giải trình tự điện di mao quản), trong đó enzyme DNA polymerase xúc tác sinh tổng hợp các mạch mới từ các nucleotide gắn huỳnh quang bổ sung với mạch khuôn DNA (đây là công nghệ giải trình tự bằng sinh tổng hợp – sequencing by synthesis technology – SBS). Trong mỗi chu kỳ tổng hợp, các nucleotides mỗi khi gắn vào mạch mới sẽ được nhận biết bởi tín hiệu huỳnh quang phát ra. Trình tự được giải từng nucleotide nên đảm bảo sự chính xác, vì thế loại bỏ tương đối lỗi trình tự nucleotide sai, đặc biệt trong trường hợp giải các đoạn nucleotide lặp lại (homopolymer). Sự khác biệt cơ bản của kỹ thuật NGS với kỹ thuật Sanger đó là công nghệ NGS giải trình tự hàng triệu loại DNA cùng lúc trong một mô hình song song hỗn hợp (massively parallel fashion). Vì vậy, dữ liệu thu được từ mỗi một lần chạy có thể từ 300 kilobases đến nhiều terabases, tùy thuộc loại thiết bị và model máy (Miniseq, Miseq, Hiseq...). Quy trình giải trình tự bằng công nghệ Illumina NGS gồm 4 bước cơ bản:

+ Chuẩn bị thư viện (library preparation): Các phân tử DNA hoặc cDNA được cắt ngẫu nhiên thành đoạn nhỏ, sau đó hai đầu 3' và 5' của các đoạn được gắn adapter (giai đoạn tagmentation). Các đoạn DNA đã gắn adapter được khuếch đại thông qua phản ứng PCR và sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch

+ Tạo khóm (Cluster generation): Các đoạn DNA trong thư viện được gắn cố định trên bề mặt của flowcell thông qua liên kết được hình thành giữa các oligo trên bề mặt flowcell với adapter. Mỗi đoạn DNA sau đó được nhân lên nhiều lần thông qua cầu khuyếch đại tạo thành các khóm cluster khác nhau. Khi cluster hình thành xong, quá trình giải trình tự bắt đầu, sử dụng mạch được tạo thành trong mỗi cluster làm mạch khuôn

+ Giải trình tự (Sequencing): Công nghệ SBS xác định từng base mỗi khi chúng được tổng hợp vào mạch mới thông qua tín hiệu huỳnh quang được phát ra.

+ Phân tích dữ liệu (Data Analysis)

**6. An toàn**

Trong quá trình thực hiện cần tuân thủ nguyên tắc thực hành an toàn tại PTN an toàn sinh học cấp II như đã quy định trong Sổ tay an toàn do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương ban hành (mã số: STAT).

**7. Đặc trưng kỹ thuật**

| Thông số | Mô tả | Tỉ lệ cần đạt |
|---|---|---|
| %Q30 Read 1 | Tỷ lệ % đọc base của Read 1 với điểm Q30 | >70% |
| %Q30 Read 2 | Tỷ lệ % đọc base của Read 2 với điểm Q30 | >70% |
| %Cluster PF | Tỷ lệ % cluster đạt chất lượng | 65-95% |
| %Occupancy | Tỷ lệ % của giếng trên flow cell có chứa cluster | 50-95% |
| Projected Total Yield | Số lượng base dự kiến được xác định cho lần chạy | Điền thông số tuỳ theo bộ kit sử dụng |

**8. Nguyên vật liệu và trang thiết bị**

**8.1 Nguyên vật liệu**

**8.1.1. Hoá chất, sinh phẩm**

- Sinh phẩm/Hoá chất tách chiết:
  + QIAamp viral RNA mini kit: Qiagen-52904: 50 test hoặc 52906: 250 test
  + High Pure Viral RNA Kit: Roche - High Pure Viral RNA Kit 11858882001 100 test
- Sinh phẩm/Hoá chất tổng hợp sợi DNA bổ trợ (cDNA): SuperScript IV VILO Master Mix 11756050 (50 test) hoặc 11756500 (500 test)
- Sinh phẩm/Hoá chất tổng hợp DNA sợi đôi (ds DNA)

+ Sinh phẩm tổng hợp ds DNA: Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix 12369010 (100 test) hoặc 12369050 (500 test)

+ Mồi sử dụng (tên – trình tự)

| PCR | PRIMER | SEQUENCE (5'-3') | LENGTH (nt) |
|---|---|---|---|
| A1 | SARS2_A1F_31 | ACCAACCAACTTTCGATCTCTTGT | 2562 |
| | SARS2_A1R_2569 | GCTTCAACAGCTTCACTAGTAGGT | |
| A2 | SARS2_A2F_4295 | ACAGTGCTTAAAAAGTGTAAAAGTGCC | 2579 |
| | SARS2_A2R_6847 | ACAGTATTCTTTGCTATAGTAGTCGGC | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| A3 | SARS2_A3F_8596 | ACTTGTGTTCCTTTTTGTTGCTGC | 2479 |
| | SARS2_A3R_11049 | GAACAAAGACCATTGAGTACTCTGGA | |
| A4 | SARS2_A4F_12711 | TACGACAGATGTCTTGTGCTGC | 2536 |
| | SARS2_A4R_15225 | TAACATGTTGTGCCAACCACCA | |
| A5 | SARS2_A5F_16847 | ACTATGGTGATGCTGTTGTTTACCG | 2432 |
| | SARS2_A5R_19254 | ACCAGGCAAGTTAAGGTTAGATAGC | |
| A6 | SARS2_A6F_21358 | ACAAATCCAATTCAGTTGTCTTCCTATTC | 2490 |
| | SARS2_A6R_23823 | TGTGTACAAAAACTGCCATATTGCA | |
| A7 | SARS2_A7F_25602 | ACTAGCACTCTCCAAGGGTGTT | 2571 |
| | SARS2_A7R_28146 | AGGTTCCTGGCAATTAATTGTAAAAGG | |
| B1 | SARS2_B1F_1876 | ATCAGAGGCTGCTCGTGTTGTA | 2575 |
| | SARS2_B1R_4429 | AGTTTCCACACAGACAGGCATT | |
| B2 | SARS2_B2F_6287 | TGGTGTATACGTTGTCTTTGGAGC | 2565 |
| | SARS2_B2R_8828 | CACTTCTCTTGTTATGACTGCAGC | |
| B3 | SARS2_B3F_10363 | TGTTCGCATTCAACCAGGACAG | 2440 |
| | SARS2_B3R_12780 | CCTACCTCCCTTTGTTGTGTTGT | |
| B4 | SARS2_B4F_14546 | AGGAATTACTTGTGTATGCTGCTGA | 2607 |
| | SARS2_B4R_17131 | ACACTATGCGAGCAGAAGGGTA | |
| B5 | SARS2_B5F_18897 | TGTTAAGCGTGTTGACTGGACT | 2559 |
| | SARS2_B5R_21428 | TGACCTTCTTTTAAAGACATAACAGCAG | |
| B6 | SARS2_B6F_23123 | CCAGCAACTGTTTGTGGACCTA | 2551 |
| | SARS2_B6R_25647 | AGGTGTGAGTAAACTGTTACAAACAAC | |
| B7 | SARS2_B7F_27447 | TCACTACCAAGAGTGTGTTAGAGGT | 2420 |
| | SARS2_B7R_29837 | TTCTCCTAAGAAGCTATTAAAATCACATGG | |

- Sinh phẩm/Hoá chất điện di sản phẩm PCR:
  + Invitrogen Ultra Pure Agarose 16500100 (100g) hoặc 16500500 (500g)
  + Invitrogen Ultra Pure TBE Buffer 10X: 15581044 (1 lít) hoặc 15581028 (10 lít).
  + Invitrogen TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder: 10488085 (50µg)
  + Invitrogen SYBR Safe DNA Gel Stain: S33102 (400µL)
- Sinh phẩm/Hoá chất tinh sạch dsDNA:
  + ThermoFisher ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent 78200.200.UL (100 reactions) hoặc 78201.1.ML (500 reactions)
- Sinh phẩm/Hoá chất đo nồng độ DNA: Qubit™ dsDNA HS Assay Kit Q32850 (100 assays) hoặc Q32854 (500 assays)

- Sinh phẩm/Hoá chất chuẩn bị thư viện giải trình tự gen: Illumina
  + Nextera XT DNA Library Preparation Kit FC-131-1024 (24 samples) hoặc Kit FC-131-1096 (96 samples)
  + Nextera XT Index Kit FC-131-1001 (24 Indexes, 96 samples) hoặc Nextera XT Index Kit v2 set A-D FC-131-2001 đến FC-131-2004 (96 Indexes, 384 samples)
- Sinh phẩm/Hoá chất tinh sạch thư viện: Beckman Coulter AMPure XP Reagent for PCR Purification A63880 (5mL) hoặc A63881 (60mL) hoặc 63882 (450mL)
- Sinh phẩm/Hoá chất giải trình tự gen theo máy (tên máy GTTG):
  + MiSeq Reagent Kit v2 (50 cycles, 300 cycles, 500 cycles)
  + MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycles, 600 cycles)
  + MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 cycles)
  + MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 cycles, 500 cycles)
  + iSeq 100 i1 Reagent v2 (single, Four-Pack, Eigh-Pack)

**8.1.2 Dụng cụ tiêu hao**

- Tuýp vô trùng các thể tích 1.5 ml, 1.7 ml, 1.8 ml, 2.0 ml
- Ống phản ứng PCR 0.2mL và nắp đậy tương ứng với thiết bị.
- Phiến 96 giếng
- Tuýp 0.5 ml dành riêng cho máy đo Qubit (Qubit Assay Tubes Q32856 – 500 tubes)
- Đầu côn có lọc 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá để tuýp
- Găng tay không bột các kích cỡ.
- Khay lạnh
- Máng (nếu cần)
- Vật tư tiêu hao riêng cho máy tách chiết tự động (nếu có)
- Giấy thấm
- Văn phòng phẩm: bút, giấy
- Cồn tuyệt đối
- NaOH 0.2N

**8. 2 Trang thiết bị**

- Máy giải trình tự gen NGS tên máy: MiSeq System hoặc iSeq 100 (Xem hướng dẫn sử dụng theo quy trình của đơn vị quản lý)
- Máy PCR: Theo quy trình NV05-VR-QT5.3.08
- Máy spindown: Theo quy trình NV05-VR-QT5.3.10
- Tủ lạnh: Theo quy trình NV05-VR-QT5.3.15
- Tủ lạnh âm (-20 °C): Theo quy trình NV05-VR-QT5.3.14

- Giá từ 96 giếng cho tuýp 0.2ml
- Máy đo Qubit Fluorometric Quantification
- Micropipet các cỡ theo mã: <10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Pipet đa kênh theo các cỡ: <10 µl, 50 µl, 300 µl
- Điều kiện bảo quản: theo hướng dẫn tại quy trình quản lý QL04-QT01.

**8.3. Chứng chuẩn**

- Không áp dụng đối với GTTG SARS-CoV-2

**9. Kiểm soát chất lượng**

**9.1. Yếu tố ảnh hưởng**

Các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả xét nghiệm bao gồm:

- Chất lượng mẫu: mẫu lấy không đúng kỹ thuật, không đúng loại mẫu yêu cầu có thể ảnh hưởng và dẫn tới GTTG bị lỗi.
- Thời điểm lấy mẫu: thời điểm lấy mẫu cách thời điểm khởi phát quá dài dẫn đến tải lượng virus thấp, không đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào của GTTG.
- Hoá chất sử dụng: sử dụng các hoá chất hết hạn có thể gây ảnh hưởng tới kết quả GTTG.
- Thao tác kỹ thuật: thực hiện đúng theo quy trình, sử dụng đúng loại pipet và thể tích phù hợp để đảm bảo kết quả GTTG
- Trang thiết bị: đảm bảo vận hành tốt, không bị lỗi
- Nhiệt độ, độ ẩm phòng làm thư viện và chạy máy: đảm bảo theo đúng các tiêu chuẩn yêu cầu để máy chạy không bị dừng đột ngột dẫn đến mẻ chạy GTTG bị lỗi

**9.2. Kiểm soát nguyên vật liệu và trang thiết bị**

- Các nguyên vật liệu trước khi đưa vào sử dụng đã được kiểm tra chất lượng.
- Các tủ lạnh phải được theo dõi nhiệt độ hàng ngày và trong giới hạn cho phép.
- Các trang thiết bị được bảo dưỡng định kỳ và trong thời hạn hiệu chuẩn (nếu phù hợp).
- Điều kiện môi trường của PTN phải trong giới hạn cho phép.

**9.3. Kiểm soát mẫu bệnh phẩm**

- Loại mẫu: đảm bảo chất lượng theo yêu cầu tại quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản bệnh phẩm theo Quy trình thu thập mẫu bệnh phẩm khoa virus NV05-VR-QT5.4.1
- Tiêu chí loại bỏ: Theo Quy trình thu thập mẫu bệnh phẩm khoa virus NV05-VR-QT5.4.1

**9.4. Kiểm soát mẫu chứng**

- Không áp dụng đối với GTTG SARS-CoV-2

### 9.5. Chương trình ngoại kiểm

Tham gia chương trình ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng (nếu có).

## 10. Nội dung

### 10.1 Lưu đồ

| Bước | Trách nhiệm | Trình tự thực hiện | Tài liệu |
|---|---|---|---|
| 1 | Nhân viên PTN | Chuẩn bị mẫu và quản lý dữ liệu của mẫu | NV05-VR-QT5.4.1 |
| 2 | Nhân viên PTN | Tách chiết vật liệu di truyền | NV05-VR-QT5.5.2 |
| 3 | Nhân viên PTN | Phản ứng tạo cDNA | NV05-VR02-QT5.5.06-BM02 |
| 4 | Nhân viên PTN | Phản ứng PCR tạo các đoạn DNA sử dụng mồi đặc hiệu | NV05-VR02-QT5.5.06-BM03 |
| 5 | Nhân viên PTN | Điện di và tinh sạch sản phẩm phản ứng PCR (nếu sản phẩm không đạt thì quay lại bước 4 hoặc 2) | NV05-VR02-QT5.5.06-BM04 |
| 6 | Nhân viên PTN | Đo nồng độ DNA, pha loãng về nồng độ chuẩn bị thư viện | NV05-VR02-QT5.5.06-BM05<br>NV05-VR02-QT5.5.06-BM06 |
| 7 | Nhân viên PTN | Chuẩn bị thư viện | NV05-VR02-QT5.5.06-BM07<br>NV05-VR02-QT5.5.06-BM08<br>NV05-VR02-QT5.5.06-BM09 |
| 8 | Nhân viên PTN | Chạy máy GTTG | NV05-VR02-QT5.5.06-BM10<br>NV05-VR02-QT5.5.06-BM11 |
| 9 | Nhân viên PTN<br>Trưởng PTN | Nhận định kết quả (nếu kết quả không đạt thì quay lại bước 8 hoặc 6) | QL10-QĐ01-PL04 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10 | Nhân viên PTN<br>Nhân viên phụ trách khử nhiễm | Xử lý mẫu và khử nhiễm | QL09-QT11 |
| 11 | Nhân viên PTN<br>Trưởng PTN | Quản lý dữ liệu xét nghiệm và trả kết quả | NV05-QT5.8.01 |

**10.2. Các bước thực hiện**

**10.2.1 Chuẩn bị mẫu và quản lý dữ liệu của mẫu**

Chuẩn bị mẫu và quản lý dữ liệu của mẫu theo quy trình NV05-VR-QT5.4.1

**10.2.2 Tách chiết RNA theo quy trình**

Tách chiết RNA được thực hiện theo quy trình NV05-VR-QT5.5.2 tại PTN Cúm, Khoa Vi rút.

**10.2.3 Phản ứng tạo cDNA**

Hoá chất được chuẩn bị theo bảng bên dưới

| **Reagent** | **x 1 (µl)** | **N phản ứng** |
|---|---|---|
| SuperScript IV VILO Master Mix (5X) | 5 | 5 x N |
| H2O | 15 | 15 x N |
| RNA | 5 | Chia mỗi tube 20 ul |
| Total | 25 | |

Chương trình nhiệt:

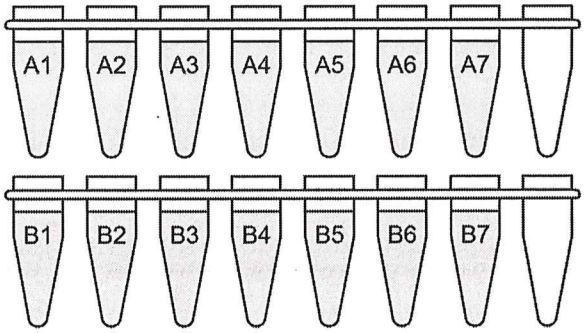
| **Step** | **Temp (°C)** | **Time (mm:ss)** |
|---|---|---|
| Priming | 25 | 10:00 |
| Extension | 50 | 20:00 |
| Denature RT | 85 | 5:00 |
| Hold | 4 | ∝ |

**10.2.4 Phản ứng PCR 14 đoạn sử dụng mồi đặc hiệu**

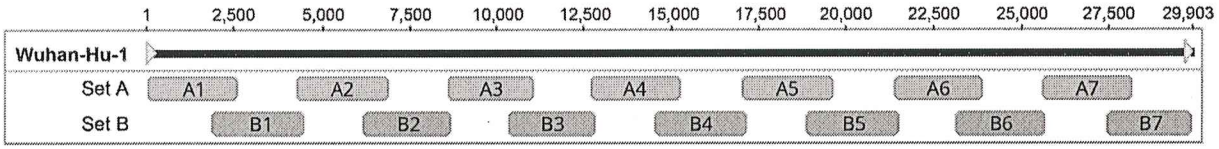
a. chuẩn bị Primer Pool mỗi loại

- Bổ sung H2O hoặc TE tương ứng vào từng tube mồi đang ở dạng đông khô để được nồng độ mồi là 100 µM

- Chuẩn bị tube mồi pool cho từng set (A hoặc B) như sau: trộn 5 µl mồi Forward (100µM), 5 µl mồi Reverse (100µM), 190 µl H2O vào strip 8 và ghi nhãn tên mồi (như hình bên dưới)




b. Phản ứng PCR 14 mảnh




Vị trí các đoạn DNA được nhân lên tương ứng với tên mồi (14 đoạn)

Thành phần phản ứng PCR 14 đoạn SARS-CoV-2

| | **x 1 (µl)** | **N phản ứng** |
|---|---|---|
| Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix (2X) | 10 | 10 x N |
| H2O | 6.5 | 6.5 x N |
| Primer pool (5uM) | 2 | 2 x N |
| Single strand cDNA | 1.5 | Chia đều mỗi tube 18.5ul |
| TOTAL | 20 | |

Chương trình nhiệt

| **Step** | **Temp (°C)** | **Time (mm:ss)** | **Cycles** |
|---|---|---|---|
| Hot start | 98 | 2:00 | 1X |
| Denaturation | 98 | 00:15 | 40X |
| Annealing | 65 | 00:30 | |
| Extension | 72 | 02:00 | |
| Final extesion | 72 | 5:00 | 1X |
| Hold | 4 | ∝ | |

**10.2.5. Điện di và tinh sạch sản phẩm phản ứng PCR**

*10.2.5.1. Điện di*

Điện di sản phẩm PCR 14 mảnh vi rút SARS-CoV-2 được thực hiện tại phòng diện di, PTN Cúm, khoa Vi rút, Viện VSDTTW. Quá trình này gồm các bước như sau:
- Chuẩn bị thạch điện di: chuẩn bị thạch agarose gel 1% bằng cách pha 1g agarose + 100 ml dung dịch buffer TBE/TAE 1X + 15ul SYBR Safe DNA Gel Stain. Đổ thạch khay 17 giếng, 2 hàng lược.
- Dung dịch đệm màu tra mẫu điện di: 5ul sản phẩm PCR + 1ul Dye màu nhuộm
- Sử dụng 5 ul ladder cho mỗi hàng lược điện di
- Điện di sản phẩm PCR tại hiệu điện thế 135V, trong thời gian 8-10 phút
- Chụp ảnh điện di
- Lưu hình ảnh theo từng folder theo từng lần chạy GTTG
- Nhận định kết quả: (nếu sản phẩm không đạt thì thực hiện lại điện di hoặc chạy PCR 14 mảnh)

*10.2.5.2. Tinh sạch sản phẩm PCR*

Sản phẩm PCR điện di có band, được trộn vào nhau theo cùng thể tích (mỗi mẫu có 14 mảnh, hút cùng thể tích 14 ống PCR tương ứng các mảnh này của mẫu vào nhau). Voltex để trộn đều các mảnh này với nhau.

Tinh sạch sản phẩm điện di được thực hiện tại phòng chuẩn bị thư viện GTTG, PTN Cúm, khoa Vi rút, Viện VSDTTW giống như các tác nhân khác.
Tinh sạch sản phẩm PCR với các hoá chất như sau:

| | **x 1 (µl)** | **Chương trình nhiệt** |
|---|---|---|
| **Sản phẩm PCR** | **10** | 37 °C/30 phút |
| **EXOSAP IT** | **4** | 80 °C/15 phút |

Sản phẩm PCR sau tinh sạch chưa dùng ngay có thể cất tủ âm $20^0$C trong vòng 7 ngày.

**10.2.6 Đo nồng độ DNA, pha loãng về nồng độ chuẩn bị thư viện**

Tinh sạch sản phẩm điện di được thực hiện tại phòng chuẩn bị thư viện GTTG, PTN Cúm, khoa Vi rút, Viện VSDTTW.

Mô tả các bước thực hiện:

- Lập danh sách mẫu, sử dụng biểu mẫu đo nồng độ Qubit (NV05-VR02-QT5.5.06-BM04)
- Chuẩn bị ống Qubit = số mẫu + 2 standard

- Pha Qubit working Solution: pha loãng Qubit reagent theo tỉ lệ 1:200 sử dụng Qubit Buffer. Pha cho mỗi lần sử dụng, không pha sẵn, pha theo số mẫu và 2 standard mỗi lần đo
- Pha loãng 1/10 các tube mẫu sản phẩm PCR đã tinh sạch để đo: 5ul sản phẩm PCR tinh sạch + 45 ul H2O
- Mix mẫu đo theo bảng sau:

| | **N=1** | **N = (n+2)** |
|---|---|---|
| ***Qubit working solution*** | | |
| Qubit reagent | 1 | n+2 |
| Qubit buffer | 199 | 199 (n + 2) |
| ***Mix*** | | |
| | **Standard** | **Sample** |
| Qubit working solution | 190 ul | 197 ul |
| Template | 10 ul | 3 ul |
| Tổng thể tích | 200 ul | 200 ul |

- Vortex mỗi tube 2-3 giây
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút (tránh ánh sáng trực tiếp)
- Khởi động máy đo Qubit, chọn chế độ tương ứng với mục đích đo
- Đo Standard 1 và Standard 2
- Đo Sample, chọn đơn vị quy đổi ng/ul và chọn thể tích template (3ul)
- Đo lần lượt các mẫu, ghi kết quả đo được vào biểu mẫu.
- Tính toán để có thể tích H2O cần pha loãng để có DNA nồng độ 0.2ng/ul, pha loãng mẫu bằng nước theo công thức C1xV1=C2xV2

**10.2.7 Chuẩn bị thư viện**

Toàn bộ các bước của quá trình chuẩn bị thư viện được thực hiện tại phòng chuẩn bị thư viện GTTG, PTN Cúm, khoa Vi rút, Viện VSDTTW.

*a. Gắn taqment*

Các bước tiến hành

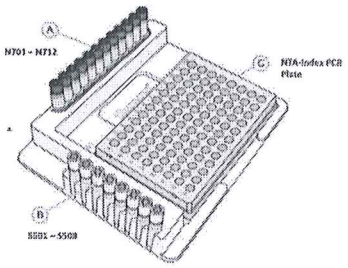
Chuẩn bị strip ống 0.2ml để chuẩn bị thư viện (không dùng ống 0.1ml)

| | **x 1 (µl)** | | |
|---|---|---|---|
| TD | 5 | Pipet mix 10 lần | 55 °C/ 5 phút<br>10 °C/ ∞<br>Ngay khi nhiệt độ giảm đến 10 °C bổ sung ngay NT |
| DNA (0.2ng/ul) | 3 | | |
| ATM | 2.5 | Pipet mix 10 lần<br>Spin down | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| NT | 2.5 | | Nhiệt độ phòng 5 phút |
| Tổng thể tích | 13 | Voltex, spin down | |

*b. Gắn Index và thực hiện PCR*

- Lựa chọn index phù hợp với số mẫu, ghi sơ đồ index cho từng mẫu.



Cho lần lượt hoá chất vào tube chuẩn bị thư viện phía như sau

| | **x 1 (µl)** |
|---|---|
| **DNA đã Taqment (bước trên)** | 13 |
| Index i7 (12 tuýp nắp cam) | 2.5/ 1 index |
| Index i5 (8 tuýp nắp trắng) | 2.5/ 1 index |
| NPM | 7.5<br>pipet mix đều hỗn hợp, spin down |
| Tổng thể tích | 25 |

| **Chu kỳ PCR gắn Index** | |
|---|---|
| 72 °C/ 3 phút<br>95 °C/ 30 giây | |
| 95 °C/ 30 giây<br>55 °C/ 30 giây<br>72 °C/ 30 giây | 15 chu kỳ |
| 72 °C/ 5 phút<br>4 °C/ ∞ | |

*Sau bước này có thể lưu mẫu ở 2-8°C trong 2 ngày, hoặc lưu trên máy PCR qua đêm*

*c. Tinh sạch sản phẩm PCR*

Chuẩn bị Ethanol 80% dùng cho quá trình tinh sạch. Chú ý không dùng ethanol cũ, luôn pha mới mỗi lần tinh sạch.

Hoá chất tinh sạch AMPure XP beads phải để ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi thực hiện để đảm bảo hoá chất trở về nhiệt độ phòng.

Các bước thực hiện

- Votex ống AMPure bead cho tan đều hạt từ vào hoá chất, spindown
- Mix sản phẩm PCR và bead theo tỷ lệ 1:1 (25ul sản phẩm PCR+ 25 ul AMPure XP Bead)
- Vortex tuýp chứa sản phẩm PCR có gắn Index và Bead trên máy trong 2 phút, 1800rpm
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Nếu hạt bead bắn lên trên nắp tube thì spin down nhẹ.
- Cho tube lên giá từ và để trong 2 phút hoặc tới khi dung dịch trở nên trong suốt, các hạt từ bám hết lên vị trí tiếp xúc với từ.
- Hút bỏ toàn bộ dịch nổi mà không chạm vào hạt bead. Nếu chạm vào thì trả lại dung dịch, chờ thêm 2 phút nữa trên giá từ để dung dịch trong suốt rồi hút bỏ dịch nổi.
- Rửa 2 lần bằng Ethanol 80%
    - Thực hiện trên giá từ
    - Bổ sung 200ul ethanol 80%, không mix
    - ủ trong 30 giây
    - Dùng pipet hút bỏ dịch
- Có thể sử dụng pipet loại nhỏ để hút bỏ hoàn toàn ethanol còn sót lại
- Để tube mở nắp, khô trong nhiệt độ phòng cho đến khi hạt bead se mặt lại (trong khoảng 5-10 phút tuỳ điều kiện phòng). Tránh để hạt Bead quá ướt (còn EtOH) hoặc quá khô (đứt gãy DNA)
- Đặt mẫu vào khay thường, bổ sung 25 ul RSB vào mỗi mẫu
- Sử dụng votex, shaking ở 1800rpm trong 2 phút, spindown
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút
- Đặt mẫu lên giá từ, đợi dịch trong (khoảng 2 phút)
- Dùng pipet thu hồi 22.5 ul dịch trong chứa DNA đã tinh sạch

Sau bước này có thể lưu mẫu ở -20°C trong 7 ngày

*d. Đo nồng độ thư viện*

- Kiểm tra chất lượng thư viện bằng phương pháp:
    - Qubit kit: các bước thực hiện theo ***Đo nồng độ sản phẩm PCR sau tinh sạch sử dụng Qubit kit*** mục 10.2.6
    - Điện di agarose: kiểm tra kích thước band 5 µl/mẫu để biết kích thước. thực hiện theo ***Điện di và tinh sạch sản phẩm phản ứng PCR*** mục 10.5.2. Kích thước thư viện của vi rút SARS-CoV-2 thường là 500bp.

Từ các kết quả nồng độ ug/ul và kích thước của mẫu có thể tính toán ra nồng độ nM

*e. Làm đồng đều thư viện, trộn lẫn vào nhau*

- Đồng đều thư viện sử dụng phương pháp ***Standard Normalization*** của Illumina.
- Dựa vào kết quả đo nồng độ Qubit và kích thước band thư viện điện di agarose, tính lượng mẫu và RSB cần để pha loãng thư viện mỗi mẫu về nồng độ **1-4 nM**
  Công thức tính như sau: C1 x V1 = C2 x V2
  nM = 10^6 x [nồng độ mẫu ng/ul]/(kích thước trung bình bp x 660 g/mol)
- Công thức tính được lập trên bảng excel để sử dụng

| | | | | C1 | V2 | C2 | V1 | RSB=V2-V1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ID | Nồng độ (ng/ul) | Kích thước trung bình | Kích thước phân tử | Nồng độ sau tạo thư viện + tinh sạch (nM) | Tổng thể tích V2 | 2 nM | Thể tích thư viện mỗi mẫu (ul) | Thể tích RSB cần |
| 1 | 9.17 | 500 | 660 | 27.8 | 27.8 | 2 | 2 | 25.8 |
| 2 | 4.42 | 500 | 660 | 13.4 | 13.4 | 2 | 2 | 11.4 |
| 3 | 14.6 | 500 | 660 | 44.2 | 44.2 | 2 | 2 | 42.2 |

Tuỳ theo chạy máy GTTG iSeq (1nM) hay MiSeq (4nM) mà pha loãng về nồng độ tương ứng

### 10.2.8. Chạy máy GTTG

***a. chạy máy iSeq***

- **Pool thư viện:** hút cùng thể tích (vd: 6ul) các mẫu đã được làm đồng đều vào cùng một tube. Voltex và spin down
- Đo lại nồng độ tube thư viện pool này để có kết quả chính xác nhất trước khi pha loãng chạy máy (thư viện 1nM)
- **Pha loãng thư viện này** về nồng độ **80pM** trong RSB (pha loãng khoảng 12,5 lần với thư viện 1nM). Thư viện đã pha loãng phải dùng ngay trong ngày
  vd: thư viện theo lý thuyết là 1nM, đo lại được 1nM
  8ul thư viện 1nM + 92 ul RSB = 100ul thư viện nồng độ 80pM
- Hút 20ul mẫu cho vào cartridge của máy để chạy

***b. chạy máy Miseq***

- **Pool thư viện:** hút cùng thể tích (vd: 6ul) các mẫu đã được làm đồng đều vào cùng một tube.
- Đo lại nồng độ tube thư viện pool này để có kết quả chính xác nhất trước khi pha loãng chạy máy (thư viện 4 nM)
- Hút mẫu và hoá chất theo công thức sau:

| | **x 1 (µl)** | |
|---|---|---|
| Thư viện Pool 4nM | 5 | Vortex, spin down<br>Ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút |
| NaOH 0.2N | 5 | |
| HT1 | 990 | |

| | | |
|---|---|---|
| Tổng thể tích | 1000 | Nồng độ 20pM |

- Từ thư viện nồng độ 20pM, pha loãng về nồng độ chạy máy với bộ sinh phẩm tương ứng bằng hoá chất HT1.

  VD:

  Thư viện pool theo lý thuyết là 4nM, đo lại được nồng độ 3,67nM.

  Bộ sinh phẩm chạy máy là MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 cycles)

  Trộn 5ul TV+ 5ul NaOH 0.2N + 990ul HT1 = 1000 ul thư viện nồng độ 18.35pM

  545ul thư viện 18.35pM + 455 ul HT1 = 1000ul thư viện nồng độ 10pM chạy máy với bộ MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 cycles)

**10.2.9 Nhận định kết quả**

- Xem xét chất lượng trình tự gen: dựa vào đặc trưng kỹ thuật tại mục 7.
- Sử dụng phần mềm để tạo trình tự gen hoàn chỉnh. Nhận định kết quả của trình tự tổng hợp sau ghép nối:
  - Đạt: Trình tự gen có đủ độ bao phủ cần thiết để phân tích
  - Không đạt: Trình tự gen KHÔNG có đủ độ bao phủ cần thiết để phân tích

  Nếu trình tự gen không đạt, thì làm lại bước chạy máy hoặc chuẩn bị thư viện/tagmentation hoặc chuẩn bị thư viện/làm đồng đều mẫu.
  - Lưu trữ và kiểm tra lại trình tự.
  - Phân tích trình tự chung thu được để xác định sự biến đổi trình tự, xác định kiểu gen hoặc phân tích đột biến kháng thuốc, sử dụng các công cụ tin sinh học cần thiết cho các mục đích khác nhau.

Nếu kết quả không đạt thì quay lại bước chạy máy hoặc chuẩn bị thư viện/tagmentation hoặc chuẩn bị thư viện/làm đồng đều mẫu tuỳ theo kết quả thu được.

**10.2.10 Xử lý mẫu và khử trùng, khử nhiễm**

**10.2.10.1 Xử lý mẫu**

Theo quy trình xử lỹ mẫu đã có của viện QL09-QT11

**10.2.10.2 Lưu giữ, bảo quản**

- Mẫu bệnh phẩm sau khi xét nghiệm sẽ được lưu giữ tại PTN - Viện VSDTTƯ.
- Xem quy trình lưu giữ mẫu sau xét nghiệm NV05-QT5.7.01.

| **Mẫu** | **Điều kiện** | **Thời gian lưu** (sau khi trả kết quả) |
|---|---|---|
| Bệnh phẩm lâm sàng | -80$^0$C | 5 năm |
| Chủng phân lập | -80$^0$C | 5 năm |

- Tùy theo tình hình thực tế của PTN mà có thể lưu giữ hoặc hủy mẫu sớm hay muộn hơn thời gian quy định.

**10.2.10.3. Huỷ mẫu**

- Mẫu bệnh phẩm hết thời gian bảo quản hoặc không dùng trong xét nghiệm sẽ được hủy theo tiêu chuẩn an toàn sinh học của luật sở tại (trong nước/nội bộ) và theo hệ thống quản lý chất lượng.
- Xem quy trình tiêu hủy bệnh phẩm NV05-QT5.7.02.

**10.2.10.4. Khử nhiễm sau xét nghiệm**

- Khử nhiễm tại PTN:
  - Khu vực làm việc: QL07-QT05
  - Trang thiết bị: QL04-QT01
  - Mẫu bệnh phẩm: QL09-QT11
- Xử lý rác thải: Xem hướng dẫn phân loại và xử lý chất thải mục 8.3 (STAT) và quy trình "Thu gom và xử lý chất thải lây nhiễm" (mã số: QL09-QT11).

**10.2.11 Quản lý dữ liệu và trả kết quả**

Thông tin dữ liệu của mẫu bệnh phẩm và báo cáo trả lết quả được thực hiện theo quy trình NV05-QT5.8.08

**11. Phụ lục và biểu mẫu**

| STT | Tên phụ lục, biểu mẫu | Mã số |
|---|---|---|
| 1 | Biểu mẫu tách chiết RNA từ mẫu bệnh phẩm | NV05-VR02-QT5.5.06-BM01 |
| 2 | Biểu mẫu tạo cDNA sợi đơn | NV05-VR02-QT5.5.06-BM02 |
| 3 | Biểu mẫu tạo dsDNA | NV05-VR02-QT5.5.06-BM03 |
| 4 | Biểu mẫu tinh sạch DNA | NV05-VR02-QT5.5.06-BM04 |
| 5 | Biểu mẫu đo nồng độ DNA bằng Qubit | NV05-VR02-QT5.5.06-BM05 |
| 6 | Biểu mẫu pha loãng nồng độ DNA | NV05-VR02-QT5.5.06-BM06 |
| 7 | Biểu mẫu Tagmentation | NV05-VR02-QT5.5.06-BM07 |
| 8 | Biểu mẫu gắn Index | NV05-VR02-QT5.5.06-BM08 |
| 9 | Biểu mẫu tinh sạch sản phẩm sau khi gắn Index | NV05-VR02-QT5.5.06-BM09 |
| 10 | Biểu mẫu làm đồng đều nồng độ mẫu | NV05-VR02-QT5.5.06-BM10<br>NV05-VR02-QT5.5.06-BM11 |

**12. Hồ sơ**

| STT | Tên hồ sơ | Đơn vị lưu trữ | Hình thức lưu | Thời gian lưu |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Hồ sơ tách chiết mẫu | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 2 | Hồ sơ cDNA | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 3 | Hồ sơ đo nồng độ DNA | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 4 | Hồ sơ pha loãng mẫu chuẩn bị thư viện | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 5 | Hồ sơ làm đồng đều thư viện | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 6 | Hồ sơ giải trình tự mẫu | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 7 | Hồ sơ theo dõi kết quả giải trình tự | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |

**13. Tài liệu tham khảo**

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/iseq100/translations/iseq-100-system-guide-1000000036024-vie.pdf

nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf

iseq-100-sequencing-system-guide-1000000036024-05.pdf

bead-based-normalization-tech-note-470-2016-007.pdf

https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B37419

https://genome.med.harvard.edu/documents/sequencing/Agencourt_AMPure_Protocol.pdf

https://genome.med.harvard.edu/documents/libraryPrep/IlluminaNexteraXTProtocol.pdf

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/qubit_assays_qrc.pdf

https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-genome-sequencing-using-long-pooled-amp-kxygxeob4v8j/v1

| | | |
|---|---|---|
| Tổng thể tích | 1000 | Nồng độ 20pM |

- Từ thư viện nồng độ 20pM, pha loãng về nồng độ chạy máy với bộ sinh phẩm tương ứng bằng hoá chất HT1.

  VD:

  Thư viện pool theo lý thuyết là 4nM, đo lại được nồng độ 3,67nM.

  Bộ sinh phẩm chạy máy là MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 cycles)

  Trộn 5ul TV+ 5ul NaOH 0.2N + 990ul HT1 = 1000 ul thư viện nồng độ 18.35pM

  545ul thư viện 18.35pM + 455 ul HT1 = 1000ul thư viện nồng độ 10pM chạy máy với bộ MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 cycles)

**10.2.9 Nhận định kết quả**

- Xem xét chất lượng trình tự gen: dựa vào đặc trưng kỹ thuật tại mục 7.
- Sử dụng phần mềm để tạo trình tự gen hoàn chỉnh. Nhận định kết quả của trình tự tổng hợp sau ghép nối:
  - Đạt: Trình tự gen có đủ độ bao phủ cần thiết để phân tích
  - Không đạt: Trình tự gen KHÔNG có đủ độ bao phủ cần thiết để phân tích

  Nếu trình tự gen không đạt, thì làm lại bước chạy máy hoặc chuẩn bị thư viện/tagmentation hoặc chuẩn bị thư viện/làm đồng đều mẫu.
  - Lưu trữ và kiểm tra lại trình tự.
  - Phân tích trình tự chung thu được để xác định sự biến đổi trình tự, xác định kiểu gen hoặc phân tích đột biến kháng thuốc, sử dụng các công cụ tin sinh học cần thiết cho các mục đích khác nhau.

Nếu kết quả không đạt thì quay lại bước chạy máy hoặc chuẩn bị thư viện/tagmentation hoặc chuẩn bị thư viện/làm đồng đều mẫu tuỳ theo kết quả thu được.

**10.2.10 Xử lý mẫu và khử trùng, khử nhiễm**

**10.2.10.1 Xử lý mẫu**

Theo quy trình xử lỹ mẫu đã có của viện QL09-QT11

**10.2.10.2 Lưu giữ, bảo quản**

- Mẫu bệnh phẩm sau khi xét nghiệm sẽ được lưu giữ tại PTN - Viện VSDTTƯ.
- Xem quy trình lưu giữ mẫu sau xét nghiệm NV05-QT5.7.01.

| **Mẫu** | **Điều kiện** | **Thời gian lưu** (sau khi trả kết quả) |
|---|---|---|
| Bệnh phẩm lâm sàng | -80$^0$C | 5 năm |
| Chủng phân lập | -80$^0$C | 5 năm |

- Tùy theo tình hình thực tế của PTN mà có thể lưu giữ hoặc hủy mẫu sớm hay muộn hơn thời gian quy định.

**10.2.10.3. Huỷ mẫu**

- Mẫu bệnh phẩm hết thời gian bảo quản hoặc không dùng trong xét nghiệm sẽ được hủy theo tiêu chuẩn an toàn sinh học của luật sở tại (trong nước/nội bộ) và theo hệ thống quản lý chất lượng.
- Xem quy trình tiêu hủy bệnh phẩm NV05-QT5.7.02.

**10.2.10.4. Khử nhiễm sau xét nghiệm**

- Khử nhiễm tại PTN:
  - Khu vực làm việc: QL07-QT05
  - Trang thiết bị: QL04-QT01
  - Mẫu bệnh phẩm: QL09-QT11
- Xử lý rác thải: Xem hướng dẫn phân loại và xử lý chất thải mục 8.3 (STAT) và quy trình "Thu gom và xử lý chất thải lây nhiễm" (mã số: QL09-QT11).

**10.2.11 Quản lý dữ liệu và trả kết quả**

Thông tin dữ liệu của mẫu bệnh phẩm và báo cáo trả lết quả được thực hiện theo quy trình NV05-QT5.8.08

**11. Phụ lục và biểu mẫu**

| STT | Tên phụ lục, biểu mẫu | Mã số |
|---|---|---|
| 1 | Biểu mẫu tách chiết RNA từ mẫu bệnh phẩm | NV05-VR02-QT5.5.06-BM01 |
| 2 | Biểu mẫu tạo cDNA sợi đơn | NV05-VR02-QT5.5.06-BM02 |
| 3 | Biểu mẫu tạo dsDNA | NV05-VR02-QT5.5.06-BM03 |
| 4 | Biểu mẫu tinh sạch DNA | NV05-VR02-QT5.5.06-BM04 |
| 5 | Biểu mẫu đo nồng độ DNA bằng Qubit | NV05-VR02-QT5.5.06-BM05 |
| 6 | Biểu mẫu pha loãng nồng độ DNA | NV05-VR02-QT5.5.06-BM06 |
| 7 | Biểu mẫu Tagmentation | NV05-VR02-QT5.5.06-BM07 |
| 8 | Biểu mẫu gắn Index | NV05-VR02-QT5.5.06-BM08 |
| 9 | Biểu mẫu tinh sạch sản phẩm sau khi gắn Index | NV05-VR02-QT5.5.06-BM09 |
| 10 | Biểu mẫu làm đồng đều nồng độ mẫu | NV05-VR02-QT5.5.06-BM10<br>NV05-VR02-QT5.5.06-BM11 |

**12. Hồ sơ**

| STT | Tên hồ sơ | Đơn vị lưu trữ | Hình thức lưu | Thời gian lưu |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Hồ sơ tách chiết mẫu | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 2 | Hồ sơ cDNA | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 3 | Hồ sơ đo nồng độ DNA | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 4 | Hồ sơ pha loãng mẫu chuẩn bị thư viện | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 5 | Hồ sơ làm đồng đều thư viện | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 6 | Hồ sơ giải trình tự mẫu | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |
| 7 | Hồ sơ theo dõi kết quả giải trình tự | PTN ZVP | Văn bản | 5 năm |

**13. Tài liệu tham khảo**

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/iseq100/translations/iseq-100-system-guide-1000000036024-vie.pdf

nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf

iseq-100-sequencing-system-guide-1000000036024-05.pdf

bead-based-normalization-tech-note-470-2016-007.pdf

https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B37419

https://genome.med.harvard.edu/documents/sequencing/Agencourt_AMPure_Protocol.pdf

https://genome.med.harvard.edu/documents/libraryPrep/IlluminaNexteraXTProtocol.pdf

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/qubit_assays_qrc.pdf

https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-genome-sequencing-using-long-pooled-amp-kxygxeob4v8j/v1

**PHỤ LỤC 4**

**Thông tin Giải trình tự mẫu SARS-CoV-2 đã được cập nhật trên GISAID**
**(Illumina Iseq 100)**

| STT | ID virus | Thời gian thu thập | ID No GISAID |
|---|---|---|---|
| 1 | hCoV-19/Vietnam/38142/2020 | 01.2020 | EPI_ISL_408668 |
| 2 | hCoV-19/Vietnam/38238/2020 | 01.2020 | EPI_ISL_660541 |
| 3 | hCoV-19/Vietnam/CM99/2020 | 02.2020 | EPI_ISL_416429 |
| 4 | hCoV-19/Vietnam/CM295/2020 | 03.2020 | EPI_ISL_416430 |
| 5 | hCoV-19/Vietnam/CM296/2020 | 03.2020 | EPI_ISL_416431 |
| 6 | hCoV-19/Vietnam/39607/2020 | 03.2020 | EPI_ISL_416428 |
| 7 | hCoV-19/Vietnam/IBT-NIHE-03/2020 | 03.2020 | EPI_ISL_479756 |
| 8 | hCoV-19/Vietnam/IBT-NIHE-05/2020 | 03.2020 | EPI_ISL_479757 |
| 9 | hCoV-19/Vietnam/IBT-NIHE-16/2020 | 03.2020 | EPI_ISL_479758 |
| 10 | hCoV-19/Vietnam/39730/2020 | 03.2020 | EPI_ISL_660542 |
| 11 | hCoV-19/Vietnam/40113/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759873 |
| 12 | hCoV-19/Vietnam/40124/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759874 |
| 13 | hCoV-19/Vietnam/40125/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759875 |
| 14 | hCoV-19/Vietnam/40126/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759876 |
| 15 | hCoV-19/Vietnam/40127/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759877 |
| 16 | hCoV-19/Vietnam/40128/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759878 |
| 17 | hCoV-19/Vietnam/40130/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759879 |
| 18 | hCoV-19/Vietnam/40131/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759880 |
| 19 | hCoV-19/Vietnam/40188/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759881 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 20 | hCoV-19/Vietnam/40213/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_759886 |
| 21 | hCoV-19/Vietnam/40139/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_766029 |
| 22 | hCoV-19/Vietnam/40143/2020 | 07.2020 | EPI_ISL_766030 |
| 23 | hCoV-19/Vietnam/40219/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759869 |
| 24 | hCoV-19/Vietnam/40228/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759870 |
| 25 | hCoV-19/Vietnam/40227/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759871 |
| 26 | hCoV-19/Vietnam/40229/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759872 |
| 27 | hCoV-19/Vietnam/40191/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759882 |
| 28 | hCoV-19/Vietnam/40201/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759883 |
| 29 | hCoV-19/Vietnam/40203/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759884 |
| 30 | hCoV-19/Vietnam/40205/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759885 |
| 31 | hCoV-19/Vietnam/40218/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759887 |
| 32 | hCoV-19/Vietnam/40230/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759888 |
| 33 | hCoV-19/Vietnam/40234/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759889 |
| 34 | hCoV-19/Vietnam/40236/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759890 |
| 35 | hCoV-19/Vietnam/CM18609/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_759891 |
| 36 | hCoV-19/Vietnam/40231/2020 | 08.2020 | EPI_ISL_766031 |
| 37 | hCoV-19/Vietnam/40826/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977145 |
| 38 | hCoV-19/Vietnam/40816/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977146 |
| 39 | hCoV-19/Vietnam/40811/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977147 |
| 40 | hCoV-19/Vietnam/40805/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977148 |
| 41 | hCoV-19/Vietnam/40867/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977149 |
| 42 | hCoV-19/Vietnam/40869/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977150 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 43 | hCoV-19/Vietnam/40868/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977151 |
| 44 | hCoV-19/Vietnam/40797/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977152 |
| 45 | hCoV-19/Vietnam/40865/2021 | 01.2021 | EPI_ISL_977153 |
| 46 | hCoV-19/Vietnam/41208/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2373108 |
| 47 | hCoV-19/Vietnam/41209/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2373109 |
| 48 | hCoV-19/Vietnam/41221/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2373110 |
| 49 | hCoV-19/Vietnam/41222/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2373111 |
| 50 | hCoV-19/Vietnam/41111.3/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479928 |
| 51 | hCoV-19/Vietnam/41143/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479929 |
| 52 | hCoV-19/Vietnam/41266/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479930 |
| 53 | hCoV-19/Vietnam/41267/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479931 |
| 54 | hCoV-19/Vietnam/41268/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479932 |
| 55 | hCoV-19/Vietnam/41269/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479933 |
| 56 | hCoV-19/Vietnam/41230/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479934 |
| 57 | hCoV-19/Vietnam/41233/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479935 |
| 58 | hCoV-19/Vietnam/41235/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479936 |
| 59 | hCoV-19/Vietnam/41237/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479937 |
| 60 | hCoV-19/Vietnam/41238/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479938 |
| 61 | hCoV-19/Vietnam/41245/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479939 |
| 62 | hCoV-19/Vietnam/41246/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479940 |
| 63 | hCoV-19/Vietnam/41247/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479941 |
| 64 | hCoV-19/Vietnam/41248/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479942 |
| 65 | hCoV-19/Vietnam/41249/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479943 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 66 | hCoV-19/Vietnam/41250/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479944 |
| 67 | hCoV-19/Vietnam/41251/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479945 |
| 68 | hCoV-19/Vietnam/41252/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479946 |
| 69 | hCoV-19/Vietnam/41253/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_2479947 |
| 70 | hCoV-19/Vietnam/41377/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_3694207 |
| 71 | hCoV-19/Vietnam/41378/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_3694229 |
| 72 | hCoV-19/Vietnam/41380/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_3694231 |
| 73 | hCoV-19/Vietnam/41382/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_3694233 |
| 74 | hCoV-19/Vietnam/41384/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_3694235 |
| 75 | hCoV-19/Vietnam/41385/2021 | 05.2021 | EPI_ISL_3694237 |
| 76 | hCoV-19/Vietnam/41459/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694240 |
| 77 | hCoV-19/Vietnam/41460/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694242 |
| 78 | hCoV-19/Vietnam/41462/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694244 |
| 79 | hCoV-19/Vietnam/41430/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694245 |
| 80 | hCoV-19/Vietnam/41432/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694247 |
| 81 | hCoV-19/Vietnam/41434/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694249 |
| 82 | hCoV-19/Vietnam/41435/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694252 |
| 83 | hCoV-19/Vietnam/41436/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694254 |
| 84 | hCoV-19/Vietnam/41437/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694256 |
| 85 | hCoV-19/Vietnam/41438/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694258 |
| 86 | hCoV-19/Vietnam/41439/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694260 |
| 87 | hCoV-19/Vietnam/41441/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694262 |
| 88 | hCoV-19/Vietnam/41449/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694264 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 89 | hCoV-19/Vietnam/41450/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694266 |
| 90 | hCoV-19/Vietnam/41451/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694268 |
| 91 | hCoV-19/Vietnam/41455/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694270 |
| 92 | hCoV-19/Vietnam/41540/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694272 |
| 93 | hCoV-19/Vietnam/41541/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694275 |
| 94 | hCoV-19/Vietnam/41542/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694277 |
| 95 | hCoV-19/Vietnam/41543/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694279 |
| 96 | hCoV-19/Vietnam/41545/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694281 |
| 97 | hCoV-19/Vietnam/41546/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694283 |
| 98 | hCoV-19/Vietnam/41547/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694285 |
| 99 | hCoV-19/Vietnam/41548/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694287 |
| 100 | hCoV-19/Vietnam/41549/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694289 |
| 101 | hCoV-19/Vietnam/41551/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694292 |
| 102 | hCoV-19/Vietnam/41552/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694294 |
| 103 | hCoV-19/Vietnam/41553/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694296 |
| 104 | hCoV-19/Vietnam/41554/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694298 |
| 105 | hCoV-19/Vietnam/41555/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694300 |
| 106 | hCoV-19/Vietnam/41556/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694302 |
| 107 | hCoV-19/Vietnam/41557/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694304 |
| 108 | hCoV-19/Vietnam/41558/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694306 |
| 109 | hCoV-19/Vietnam/41562/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694308 |
| 110 | hCoV-19/Vietnam/41563/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694311 |
| 111 | hCoV-19/Vietnam/41565/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694313 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 112 | hCoV-19/Vietnam/41566/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694315 |
| 113 | hCoV-19/Vietnam/41567/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694317 |
| 114 | hCoV-19/Vietnam/41568/2021 | 06.2021 | EPI_ISL_3694319 |
| 115 | hCoV-19/Vietnam/41687/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694321 |
| 116 | hCoV-19/Vietnam/41690/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694323 |
| 117 | hCoV-19/Vietnam/41692/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694325 |
| 118 | hCoV-19/Vietnam/41698/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694327 |
| 119 | hCoV-19/Vietnam/41702/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694329 |
| 120 | hCoV-19/Vietnam/41709/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694331 |
| 121 | hCoV-19/Vietnam/41735/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694347 |
| 122 | hCoV-19/Vietnam/41739/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694349 |
| 123 | hCoV-19/Vietnam/41743/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694351 |
| 124 | hCoV-19/Vietnam/41746/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694353 |
| 125 | hCoV-19/Vietnam/41747/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694355 |
| 126 | hCoV-19/Vietnam/41749/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694357 |
| 127 | hCoV-19/Vietnam/41752/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694359 |
| 128 | hCoV-19/Vietnam/41754/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694361 |
| 129 | hCoV-19/Vietnam/41758/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694363 |
| 130 | hCoV-19/Vietnam/41609/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694365 |
| 131 | hCoV-19/Vietnam/41610/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694368 |
| 132 | hCoV-19/Vietnam/41611/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694369 |
| 133 | hCoV-19/Vietnam/41612/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_3694371 |
| 134 | hCoV-19/Vietnam/41733/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_8920049 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 135 | hCoV-19/Vietnam/41608/2021 | 07.2021 | EPI_ISL_8920050 |
| 136 | hCoV-19/Vietnam/41712/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_3694333 |
| 137 | hCoV-19/Vietnam/41715/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_3694336 |
| 138 | hCoV-19/Vietnam/41718/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_3694338 |
| 139 | hCoV-19/Vietnam/41721/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_3694340 |
| 140 | hCoV-19/Vietnam/41724/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_3694342 |
| 141 | hCoV-19/Vietnam/41729/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_3694344 |
| 142 | hCoV-19/Vietnam/41763/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924765 |
| 143 | hCoV-19/Vietnam/41764/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924766 |
| 144 | hCoV-19/Vietnam/41765/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924767 |
| 145 | hCoV-19/Vietnam/41766/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924768 |
| 146 | hCoV-19/Vietnam/41767/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924769 |
| 147 | hCoV-19/Vietnam/41775/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924770 |
| 148 | hCoV-19/Vietnam/41776/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924771 |
| 149 | hCoV-19/Vietnam/41778/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924772 |
| 150 | hCoV-19/Vietnam/41779/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924773 |
| 151 | hCoV-19/Vietnam/41780/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924774 |
| 152 | hCoV-19/Vietnam/41781/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924775 |
| 153 | hCoV-19/Vietnam/41782/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924776 |
| 154 | hCoV-19/Vietnam/41783/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924777 |
| 155 | hCoV-19/Vietnam/41786/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924778 |
| 156 | hCoV-19/Vietnam/41787/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924779 |
| 157 | hCoV-19/Vietnam/41788/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924780 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 158 | hCoV-19/Vietnam/41791/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924781 |
| 159 | hCoV-19/Vietnam/41792/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924782 |
| 160 | hCoV-19/Vietnam/41793/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924783 |
| 161 | hCoV-19/Vietnam/41794/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924784 |
| 162 | hCoV-19/Vietnam/41795/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924785 |
| 163 | hCoV-19/Vietnam/41796/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924786 |
| 164 | hCoV-19/Vietnam/41797/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924787 |
| 165 | hCoV-19/Vietnam/41799/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_7924788 |
| 166 | hCoV-19/Vietnam/41656/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_8920051 |
| 167 | hCoV-19/Vietnam/41657/2021 | 08.2021 | EPI_ISL_8920052 |
| 168 | hCoV-19/Vietnam/41801/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924789 |
| 169 | hCoV-19/Vietnam/41803/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924790 |
| 170 | hCoV-19/Vietnam/41804/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924791 |
| 171 | hCoV-19/Vietnam/41806/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924792 |
| 172 | hCoV-19/Vietnam/41807/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924793 |
| 173 | hCoV-19/Vietnam/41808/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924794 |
| 174 | hCoV-19/Vietnam/41809/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924795 |
| 175 | hCoV-19/Vietnam/41810/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924796 |
| 176 | hCoV-19/Vietnam/41811/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924797 |
| 177 | hCoV-19/Vietnam/41812/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924798 |
| 178 | hCoV-19/Vietnam/41813/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924799 |
| 179 | hCoV-19/Vietnam/41814/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924800 |
| 180 | hCoV-19/Vietnam/41820/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924801 |

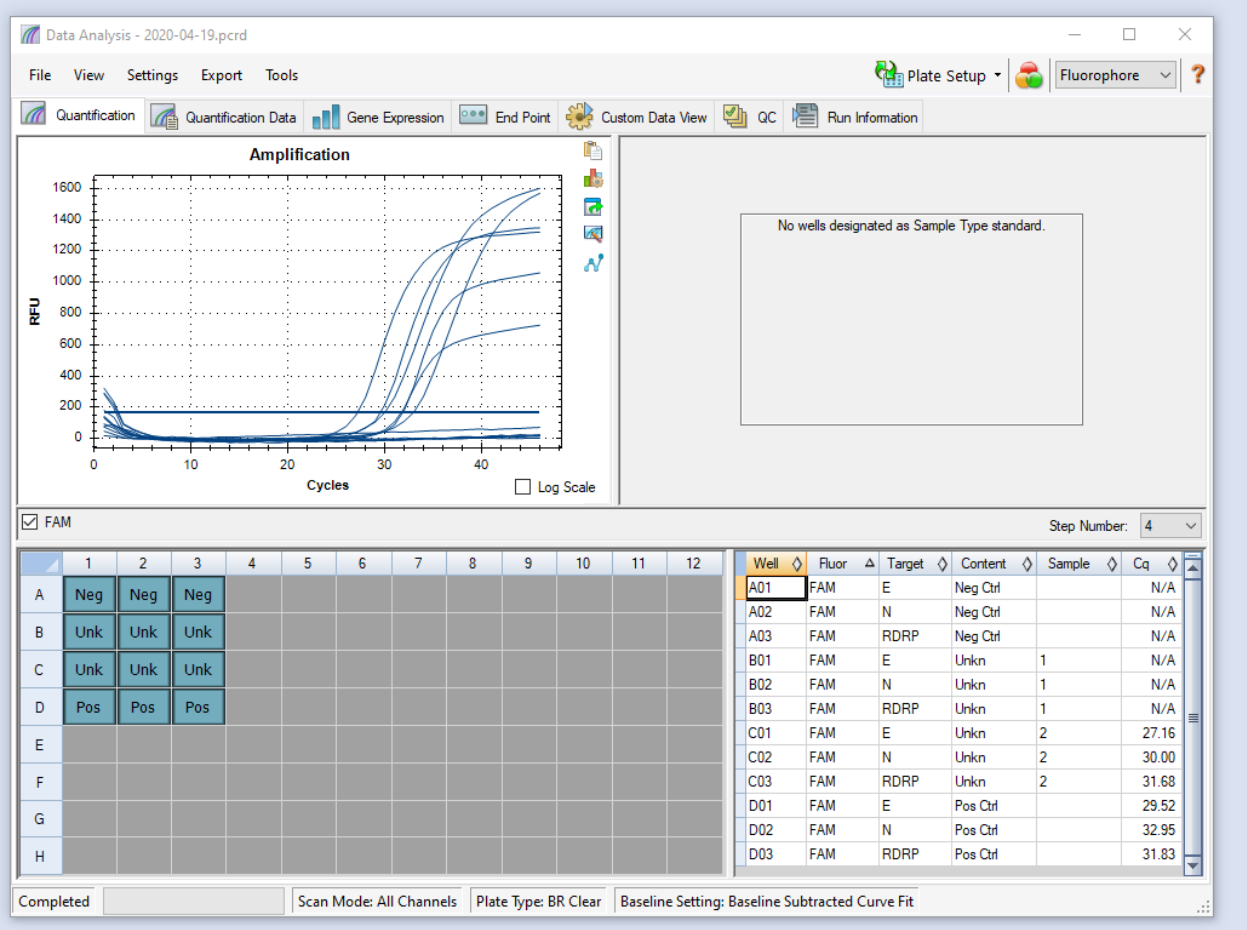
| | | | |
|---|---|---|---|
| 181 | hCoV-19/Vietnam/41821/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924802 |
| 182 | hCoV-19/Vietnam/41822/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924803 |
| 183 | hCoV-19/Vietnam/41823/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924804 |
| 184 | hCoV-19/Vietnam/41824/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924805 |
| 185 | hCoV-19/Vietnam/41825/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924806 |
| 186 | hCoV-19/Vietnam/41826/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924807 |
| 187 | hCoV-19/Vietnam/41827/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924808 |
| 188 | hCoV-19/Vietnam/41829/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924809 |
| 189 | hCoV-19/Vietnam/41830/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_7924810 |
| 190 | hCoV-19/Vietnam/41800/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_8920181 |
| 191 | hCoV-19/Vietnam/41802/2021 | 09.2021 | EPI_ISL_8920182 |
| 192 | hCoV-19/Vietnam/41840/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924811 |
| 193 | hCoV-19/Vietnam/41842/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924812 |
| 194 | hCoV-19/Vietnam/41844/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924813 |
| 195 | hCoV-19/Vietnam/41845/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924814 |
| 196 | hCoV-19/Vietnam/41847/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924815 |
| 197 | hCoV-19/Vietnam/41848/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924816 |
| 198 | hCoV-19/Vietnam/41849/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924817 |
| 199 | hCoV-19/Vietnam/41850/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924818 |
| 200 | hCoV-19/Vietnam/41852/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924819 |
| 201 | hCoV-19/Vietnam/41859/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924820 |
| 202 | hCoV-19/Vietnam/41860/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924821 |
| 203 | hCoV-19/Vietnam/41861/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924822 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 204 | hCoV-19/Vietnam/41865/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924823 |
| 205 | hCoV-19/Vietnam/41866/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924824 |
| 206 | hCoV-19/Vietnam/41868/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924825 |
| 207 | hCoV-19/Vietnam/41871/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924826 |
| 208 | hCoV-19/Vietnam/41872/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924827 |
| 209 | hCoV-19/Vietnam/41873/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924828 |
| 210 | hCoV-19/Vietnam/41874/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924829 |
| 211 | hCoV-19/Vietnam/41875/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924830 |
| 212 | hCoV-19/Vietnam/41878/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924831 |
| 213 | hCoV-19/Vietnam/41879/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924832 |
| 214 | hCoV-19/Vietnam/41880/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924833 |
| 215 | hCoV-19/Vietnam/41881/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924834 |
| 216 | hCoV-19/Vietnam/41882/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924835 |
| 217 | hCoV-19/Vietnam/41883/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924836 |
| 218 | hCoV-19/Vietnam/41884/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924837 |
| 219 | hCoV-19/Vietnam/41885/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924838 |
| 220 | hCoV-19/Vietnam/41889/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924839 |
| 221 | hCoV-19/Vietnam/41890/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924840 |
| 222 | hCoV-19/Vietnam/41891/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924841 |
| 223 | hCoV-19/Vietnam/41896/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924842 |
| 224 | hCoV-19/Vietnam/41897/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924843 |
| 225 | hCoV-19/Vietnam/41899/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924844 |
| 226 | hCoV-19/Vietnam/41902/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924845 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 227 | hCoV-19/Vietnam/41904/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924846 |
| 228 | hCoV-19/Vietnam/41905/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924847 |
| 229 | hCoV-19/Vietnam/41906/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924848 |
| 230 | hCoV-19/Vietnam/41910/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924849 |
| 231 | hCoV-19/Vietnam/41911/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924850 |
| 232 | hCoV-19/Vietnam/41912/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924851 |
| 233 | hCoV-19/Vietnam/41913/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924852 |
| 234 | hCoV-19/Vietnam/41914/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924853 |
| 235 | hCoV-19/Vietnam/41915/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924854 |
| 236 | hCoV-19/Vietnam/41916/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924855 |
| 237 | hCoV-19/Vietnam/41917/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924856 |
| 238 | hCoV-19/Vietnam/41918/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924857 |
| 239 | hCoV-19/Vietnam/41919/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924858 |
| 240 | hCoV-19/Vietnam/41920/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924859 |
| 241 | hCoV-19/Vietnam/41921/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924860 |
| 242 | hCoV-19/Vietnam/41922/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924861 |
| 243 | hCoV-19/Vietnam/41924/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924862 |
| 244 | hCoV-19/Vietnam/41926/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924863 |
| 245 | hCoV-19/Vietnam/41927/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924864 |
| 246 | hCoV-19/Vietnam/41929/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924865 |
| 247 | hCoV-19/Vietnam/41930/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924866 |
| 248 | hCoV-19/Vietnam/41931/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924867 |
| 249 | hCoV-19/Vietnam/41933/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924868 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 250 | hCoV-19/Vietnam/41937/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924869 |
| 251 | hCoV-19/Vietnam/41938/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924870 |
| 252 | hCoV-19/Vietnam/41939/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924871 |
| 253 | hCoV-19/Vietnam/41943/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924872 |
| 254 | hCoV-19/Vietnam/41944/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_7924873 |
| 255 | hCoV-19/Vietnam/41853/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_8920183 |
| 256 | hCoV-19/Vietnam/41908/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_8920184 |
| 257 | hCoV-19/Vietnam/41909/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_8920185 |
| 258 | hCoV-19/Vietnam/41928/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_8920186 |
| 259 | hCoV-19/Vietnam/41936/2021 | 10.2021 | EPI_ISL_8920187 |

# PHỤ LỤC 5




| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Neg | Neg | Neg | | | | | | | | | |
| B | Unk | Unk | Unk | | | | | | | | | |
| C | Unk | Unk | Unk | | | | | | | | | |
| D | Pos | Pos | Pos | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| Well | Fluor | Target | Content | Sample | Cq |
|---|---|---|---|---|---|
| A01 | FAM | E | Neg Ctrl | | N/A |
| A02 | FAM | N | Neg Ctrl | | N/A |
| A03 | FAM | RDRP | Neg Ctrl | | N/A |
| B01 | FAM | E | Unkn | 1 | N/A |
| B02 | FAM | N | Unkn | 1 | N/A |
| B03 | FAM | RDRP | Unkn | 1 | N/A |
| C01 | FAM | E | Unkn | 2 | 27.16 |
| C02 | FAM | N | Unkn | 2 | 30.00 |
| C03 | FAM | RDRP | Unkn | 2 | 31.68 |
| D01 | FAM | E | Pos Ctrl | | 29.52 |
| D02 | FAM | N | Pos Ctrl | | 32.95 |
| D03 | FAM | RDRP | Pos Ctrl | | 31.83 |

Hình ảnh mẫu xác định dương tính Realtime RT-PCR trong giai đoạn đầu 2020

BỘ Y TẾ
**VIỆN PASTEUR TP.HCM**
Số: 05 /GCN-PAS

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**
**Độc lập – Tự do – Hạnh phúc**

*TP.Hồ Chí Minh, ngày 21 tháng 02 năm 2020*

# CHỨNG NHẬN CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC

Căn cứ vào Quyết định số 563/QĐ-PAS ngày 20 tháng 9 năm 2016 của Viện trưởng Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh về việc thành lập Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học, trên cơ sở bản giải trình ngày 21/02/2020 của chủ nhiệm đề tài về các góp ý của hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học Viện Pasteur.

Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh chấp thuận khía cạnh đạo đức trong đề tài cấp nhà nước: **"Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học và vi rút học bệnh viêm đường hô hấp cấp do chủng vi rút corona mới 2019 (Covid-19) tại Việt Nam".**

1. Nghiên cứu viên chính: PGS.TS.BS Phan Trọng Lân
2. Cơ quan chủ trì: Viện Pasteur Tp.HCM
3. Địa điểm nghiên cứu: Việt Nam
4. Thời gian nghiên cứu: 02/2020-01/2021

Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh xác nhận Hội đồng luôn tuân thủ các nguyên tắc thực hành lâm sàng tốt – ICH GCP và Quy chế quy định hiện hành trong qua trình xem xét và phê duyệt các đề tài thử nghiệm lâm sàng.

**Ngày chấp thuận:** Ngày 21 tháng 02 năm 2020

**Mã số giấy chứng nhận: 03 /CN_HĐĐĐ**

**XÁC NHẬN CỦA VIỆN PASTEUR**

TRƯỞNG PHÒNG TỔ CHỨC CÁN BỘ

VIỆN PASTEUR TP. HỒ CHÍ MINH

Lê Đình Huân

**KT. CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG**
**PHÓ CHỦ TỊCH**

**PGS.TS. BS. Trần Ngọc Hữu**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**
**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

*Hà Nội, ngày .5...tháng .1... năm 2021*

# GIẤY XÁC NHẬN

***Kính gửi:*** Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

Tôi là: **Hoàng Vũ Mai Phương** Học hàm, học vị: **Tiến sĩ**

Cơ quan công tác: Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

Là chủ nhiệm chủ nhiệm Đề tài nhánh: **"Đặc điểm vi-rút học của SARS-CoV-2 tại miền Bắc Việt Nam"** thuộc nhiệm vụ khoa học và công nghệ "Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học và vi rút học bệnh viêm đường hô hấp cấp do chủng vi rút corona mới 2019 (covid-19) tại Việt Nam", mã số ĐTĐLCN.32/20, nguồn kinh phí: Quỹ đổi mới sáng tạo Vingroup (VinIF).

Đơn vị chủ trì: Viện Vệ sinh dịch tễ Trung

Thời gian nghiên cứu: T2/2020 – T7/2021

Thay mặt nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài, tôi đồng ý cho ThS. Nguyễn Vũ Sơn sử dụng bộ số liệu của đề tài làm kết quả nghiên cứu của luận án tiến sĩ: "**Đặc điểm phân tử SARS – CoV – 2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020 – 2021**", chuyên ngành: Vi sinh vật học, mã số: 9 42 01 07

Trân trọng./.

**Xác nhận của**
**Cơ quan chủ trì đề tài**

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

PHÓ VIỆN TRƯỞNG
*Trần Như Dương*

**Người xác nhận**

TS. HOÀNG VŨ MAI PHƯƠNG